

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 00/76550 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 47/48**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/05254**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
199 26 475.9 10. Juni 1999 (10.06.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **KTB TUMORFORSCHUNGSGESELLSCHAFT  
MBH [DE/DE];** Breisacher Strasse 117, D-79106 Freiburg  
im Breisgau (DE).

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRATZ, Felix**  
[DE/DE]; Zum Abtsweingarten 19, 79241 Ihringen (DE).

(74) Anwalt: **PERREY, Ralf; Müller-Boré & Partner, Grafen-**  
ger Strasse 2, D-81671 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **CARRIER-DRUG CONJUGATE**

(54) Bezeichnung: **TRÄGER-PHARMAKA-KONJUGATE**

(57) Abstract: The invention relates to a carrier-drug conjugate comprising a carrier containing a polypeptide sequence having one or several cysteine radicals and a pharmakon containing a pharmaceutical and/or diagnostic active substance, a spacer molecule and a thiol binding group, whereby over 0.7 mol pharmakon per mol of cysteine radical is bound to the carrier by the thiol binding group. The invention also relates to a method for the production of said conjugate and to medicaments and diagnostic kits containing said conjugate.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Träger-Pharmaka-Konjugate, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Arzneimittel und diagnostische Kits, welche die Konjugate enthalten.



**WO 00/76550 A2**

## "Träger-Pharmaka-Konjugate"

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Träger-Pharmaka-Konjugate, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Arzneimittel, welche die Konjugate enthalten.

- 5 Der Großteil der zur Zeit eingesetzten Pharmaka sind niedermolekulare Verbindungen und weisen nach systemischer Applikation eine hohe Plasma- sowie Gesamtclearance auf. Desweiteren dringen sie aufgrund von Diffusionsvorgängen in die Gewebestrukturen des Körpers ein und weisen in der Regel eine gleichmäßige Bioverteilung auf. Beide Eigenschaften führen dazu, daß nur geringe Mengen des Pharmakons den Wirkort erreichen und das Pharmakon
- 10 aufgrund seiner Verteilung auf das gesunde Gewebe des Körpers Nebenwirkungen hervorruft. Diese Nachteile sind besonders bei solchen Pharmaka ausgeprägt, die ein hohes zytotoxisches Potential besitzen, wie etwa Zytostatika oder Immunsuppressiva.
- 15 Aus diesem Grund wird nach neuen Derivaten bzw. Formulierungen gesucht, die eine selektivere Therapie ermöglichen. Zu diesem Zwecke werden Chemoimmunokonjugate bzw. Protein- oder Polymerkonjugate, bestehend aus einer geeigneten Trägersubstanz und einem Pharmakon, entwickelt.
- 20 Zum Stand der Technik auf diesem Gebiet sind Polymerkonjugate zu nennen, bei denen Zytostatika an Serumproteine, Antikörper, Wachstumsfaktoren, hormon- bzw. peptidähnliche Strukturen oder an synthetische Polymere gekoppelt sind (Mägerstädt, M.: Antibody Conjugates and Malignant Disease, Library of Congress 1990; Seymour, L.W. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1992), 9, 135-
- 25 187; Maeda, H.; Matsumura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210).

Aus DE-A-41 22 210 sind Konjugate tumoraktiver Verbindungen mit Albumin bekannt, wobei die tumoraktive Verbindung mit N-Hydroxysuccinimid und Carbodiimid aktiviert und das so erhaltene Gemisch direkt an das Trägerprotein gekoppelt wird. Nachteile dieser Konjugate liegen u.a. darin, daß sie nicht in der erforderlichen hohen Reinheit gewonnen werden können, die native Struktur des Albumins aufgrund der Herstellungsverfahren oft nicht erhalten bleibt und das stöchiometrische Verhältnis von Pharmakon zu Albumin nicht konstant und schlecht reproduzierbar ist. Desweiteren ermöglichen es diese Konjugate nicht, daß sie in geeigneter Weise im Zielgewebe bzw. in den Zielzellen freigesetzt werden können.

Daher liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, neue Träger-Pharmaka-Konjugate bereitzustellen, welche die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Konjugate überwinden.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst.

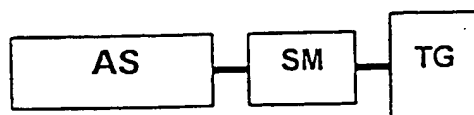
Insbesondere wird ein Träger-Pharmakon-Konjugat bereitgestellt, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind. Der Ausdruck "pharmazeutisch aktive Substanz" bedeutet, daß die betreffende Substanz entweder selbst oder nach ihrer Umsetzung durch den Stoffwechsel im jeweiligen Organismus eine pharmakologische Wirkung hervorruft und umfaßt somit auch die sich durch diese Umsetzungen ergebenden Derivate. Selbstverständlich kann die pharmazeutisch aktive Substanz ein einzelnes (beispielsweise nur als Zytostatikum) oder ein breites (beispielsweise als Zytostatikum und als Antiphlogistikum usw.) pharmakologisches Wirkspektrum aufweisen. Der Ausdruck "diagnostisch wirksame Substanz" bedeutet, daß die betreffende Substanz mittels geeigneter chemischer und/oder physikalischer Meßmethoden im Organis-

mus oder Teilen davon wie beispielsweise Zellen und/oder Flüssigkeiten wie beispielsweise dem Serum nachweisbar, vorzugsweise auch quantifizierbar ist.

Die Freisetzung der pharmazeutisch wirksamen Substanz ist bevorzugt, da in der Regel der niedermolekulare Wirkstoff mit dem Zielmolekül wechselwirken muß, um seine pharmakologische Wirksamkeit zu entfalten. Bei diagnostisch wirksamen Substanzen ist in der Regel eine Freisetzung des an das Trägemolekül gebundenen Diagnostikums nicht erforderlich, kann jedoch vorhanden sein. Erfindungsgemäß kann deshalb insbesondere eine diagnostisch wirksame Substanz zusätzlich über eine im Körper nicht spaltbare Bindung an das Spacermolekül oder direkt an die Trägemolekül-bindende Gruppe gebunden sein.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist der Träger natives oder rekombinantes Albumin.

Das Pharmakon bzw. das Pharmakonderivat im erfindungsgemäßen Konjugat läßt sich beispielsweise durch das folgende Schema darstellen (AS, pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz; SM, Spacermolekül; TG, thiolbindende Gruppe):



Das erfindungsgemäße Konjugat stellt eine Transport- und/oder Depotform der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz dar, die so gezielt bzw. in dosierter Form die Zielzellen bzw. das Zielgewebe des Pharmakons erreicht. Gegenüber den bisher bekannten Konjugaten können die Konjugate der vorliegenden Erfindung in einer höheren Reinheit gewonnen werden, die native Struktur des Trägers bleibt erhalten und das stöchiometrische Verhältnis von Pharmakon zu Träger ist konstant und reproduzierbar.

Gegenüber den in DE-A-41 22 210 beschriebenen Albumin-Zytostatika-Konjugaten

ten besitzt das erfindungsgemäße Konjugat weiterhin den Vorteil, daß zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und der thiolbindenden Gruppe ein Spacermolekül vorhanden ist, das so maßgeschneidert ist, daß die pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz oder ein entsprechendes aktives Derivat hiervon im Zielgewebe bzw. in den Zielzellen hydrolytisch und/oder pH-abhängig und/oder enzymatisch freigesetzt werden kann.

Träger wie beispielsweise Albumin bzw. deren Pharmaka-Konjugate weisen eine ausgesprochen lange Halbwertszeit im systemischen Kreislauf auf (bis zu 19 Tage - Peters, T. Jr. (1985): Serum albumin. *Adv. Protein. Chem.* 37, 161-245). Aufgrund einer erhöhten Permeabilität von Gefäßwänden des malignen, infizierten bzw. entzündeten Gewebes für Makromoleküle gelangt der Träger wie beispielsweise Serumalbumin bevorzugt in das Zielgewebe (Maeda, H.; Matsu-  
mura, Y. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, 193-210). Dadurch kann ein an einen Träger, z.B. Albumin, gekoppelter Wirkstoff gezielter den Wirkort erreichen. Desweiteren verhindert das erfindungsgemäße Träger-Pharmakon-Konjugat, das die pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz in gesunde Gewebestrukturen des Körpers diffundiert oder über die Niere eliminiert wird bzw. diese in dem Maße schädigt wie die nicht gebundene pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz. Dadurch wird das pharmakokinetische Profil der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz verändert und verbessert, da die Wirkung der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz durch eine Anreicherung am Wirkort erhöht wird und gleichzeitig die toxischen Wirkungen auf gesunde Systeme des Körpers verringert werden.

Das Konjugat der vorliegenden Erfindung besitzt eine ausgezeichnete Wasserlöslichkeit. Desweiteren zeigt das erfindungsgemäße Konjugat *in vivo* beispielsweise eine verbesserte antitumorale Wirksamkeit gegenüber der ungebundenen pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die

Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül hydrolytisch und/oder pH-abhängig und/oder enzymatisch spaltbar. Vorzugsweise enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine säurelabile Bindung. Beispiele säurelabiler Bindungen sind Ester-, Acetal-, Ketal-, Imin-, Hydrazon, Carboxylhydrazon-, Sulfonylhydrazon und eine Tritylgruppe enthaltende Bindungen. Bindungen, die durch Hydrolyse unter Freisetzung der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz gespalten werden, sind beispielsweise Esterbindungen oder Metallkomplexverbindungen, wie sie bei Platin-Dicarboxylat-Komplexen vorliegen, wobei ein Diamindiaquo-Platin(II)-Komplex freigesetzt wird. Beispiele für im Körper nicht spaltbare Bindungen, die beispielsweise bei der Verknüpfung zu einer diagnostisch wirksamen Substanz vorliegen können, sind Amidbindungen, gesättigte und ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen oder Bindungen zwischen Kohlenstoff und einem Heteroatom, -C-X-, wobei X vorzugsweise O, N, S oder P ist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine Peptidbindung. Vorzugsweise liegt die Peptidbindung innerhalb einer Peptidsequenz vor, welche mindestens eine Spaltsequenz einer Protease enthält. Daher kann die mindestens eine Peptidbindung durch Einfügen einer Peptidsequenz in das Spacermolekül und/oder in die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder in die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül realisiert werden, d.h. die jeweilige Verknüpfung ist eine Peptidbindung, und besteht vorzugsweise aus etwa 1 bis 30 Aminosäuren. Die Peptidsequenz ist dabei vorzugsweise auf die Substratspezifität bestimmter körpereigener Enzyme oder von Enzymen zugeschnitten, die in Mikroorganismen vorkommen bzw. von diesen gebildet werden. Dadurch wird die Peptidsequenz

oder ein Teil dieser Sequenz im Körper von den Enzymen erkannt und das Peptid gespalten.

Die Enzyme sind beispielsweise Proteasen und Peptidasen, z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMP), Cysteinproteasen, Serinproteasen und Plasminaktivatoren, die bei Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Krebs verstärkt gebildet oder aktiviert sind, was zum exzessiven Gewebeabbau, zu Entzündungen und zur Metastasierung führt. Targetenzyme sind insbesondere MMP 2, MMP 3 und MMP 9, die als Proteasen bei den genannten pathologischen Prozessen beteiligt sind (Vassalli, J., Pepper, M.S. (1994), *Nature* 370, 14-15, Brown, P.D. (1995), *Advan. Enzyme Regul.* 35, 291-301).

Weitere Proteasen, die Targetenzyme für Konjugate der vorliegenden Erfindung darstellen, sind Cathepsine, insbesondere Cathepsin B und H, die als Schlüsselenzyme bei entzündlichen und malignen Erkrankungen identifiziert worden sind (T. T. Lah et al. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-301).

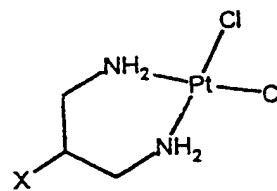
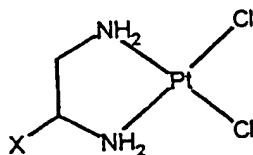
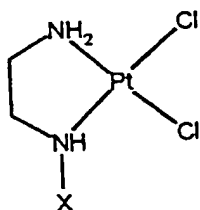
Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats enthält das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül mindestens eine Bindung, die enzymatisch spaltbar ist, aber nicht aus einer Peptidbindung besteht. Beispiele sind Carbamatbindungen, bei denen durch Spaltung mit krankheitsspezifischen Enzymen, z.B. Glutathion-S-Transferasen, Glucuronidasen, Galactosidasen, der Wirkstoff oder ein Wirkstoffderivat freigesetzt wird. Es ist auch ohne weiteres möglich, dass eine enzymatisch spaltbare Bindung aus einer Peptidsequenz und einer der vorstehend genannten Bindungen, die keine Peptidbindung ist, aufgebaut ist.

Alle genannten Bindungstypen - hydrolytisch spaltbare Bindung, säurelabile Bindung, Peptidbindung, enzymatisch spaltbare Bindung, die keine Peptidbindung enthält, und eine Bindung, die aus einer Peptidsequenz und einer nicht-Peptidbindung aufgebaut ist - gewährleisten, daß die pharmazeutisch und/oder diagno-

stisch wirksame Substanz oder ein entsprechend aktives Derivat am Wirkort extrazellulär und/oder intrazellulär gespalten wird und die Substanz seine pharmazeutische und/oder diagnostische Wirkung entfalten kann.

- 5 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die pharmazeutisch aktive Substanz ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Antirheumatikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein Analgetikum, ein Virostatikum oder ein Antimytikum. Besonders geeignete Zytostatika der Konjugate der  
10 zyklische Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin, Mitoxantron und Ametantron sowie verwandte Derivate, die Alkylantien Chlorambucil, Bendamustin, Melphalan und Oxazaphosphorine sowie verwandte Derivate, die Antimetabolite, beispielsweise Purin- oder Pyrimidinantagonisten und Folsäureantagonisten wie Methotrexat, 5-Fluorouracil, 5'-Desoxy-5-fluorouridin und Thioguanin  
15 sowie verwandte Derivate, die Taxane Paclitaxel und Docetaxel sowie verwandte Derivate, die Camptothecine Topotecan, Irinotecan, 9-Aminocamptothecin und Camptothecin sowie verwandte Derivate, die Podophyllotoxinderivate Etoposid, Teniposid und Mitopodozid sowie verwandte Derivate, die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin, Vindesin und Vinorelbin sowie verwandte Derivate, Calicheamicine, Maytansinoide und *cis*-konfigurierte Platin(II)-Komplexverbindungen  
20 der allgemeinen Formeln I bis XII:

25



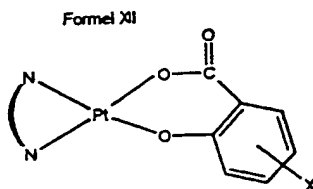
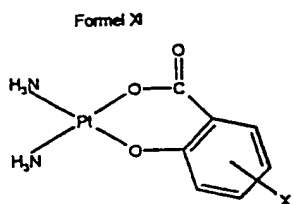
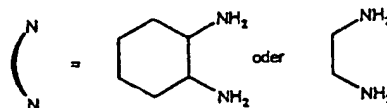
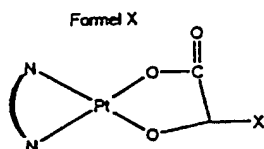
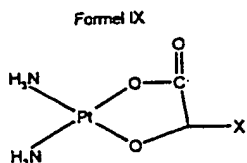
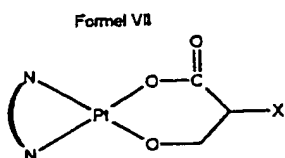
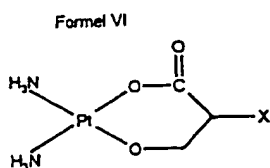
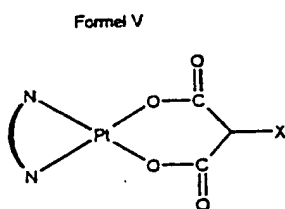
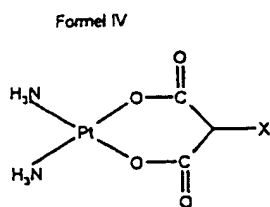
30

Formel I

Formel II

Formel III





wobei X das Spacermolekül oder die thiolbindende Gruppe ist.

Besonders geeignete Zytokine in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Interleukin 2, Interferon  $\alpha$ -2a, Interferon  $\alpha$ -2b, Interferon  $\beta$ -1a, Interferon  $\beta$ -1b, Interferon  $\gamma$ -1b und verwandte Derivate. Die verwendeten Zytokine sind i.d.R. gentechnisch hergestellte Arzneimittel.

Besonders geeignete Immunsuppressiva in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Cyclosporin A, FK 506 und verwandte Derivate.

Besonders geeignete Antirheumatika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Methotrexat, Sulfasalazin, Chloroquin und verwandte Derivate.

Besonders geeignete Antiphlogistika und/oder Analgetika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Salicylsäurederivate, wie etwa Acetylsalicylsäure und verwandte Derivate, Pharmaka-Derivate, die eine Essig- oder Propionsäuregruppe aufweisen, wie etwa Diclofenac bzw. Indometacin oder  
5 Ibuprofen bzw. Naproxen, und Aminophenolderivate, wie etwa Paracetamol.

Besonders geeignete Antimykotika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Amphotericin B und verwandte Derivate.

10 Bevorzugte Virostatika in Konjugaten der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise Nukleosidanaloga, wie Aciclovir, Ganciclovir, Idoxuridin, Ribavirin, Vidaribin, Zidovudin, Didanosin und 2',3'-Didesoxycytidin (ddC) und verwandte Derivate sowie Amantadin.

15 Bevorzugte Antibiotika im erfindungsgemäßen Konjugat sind Sulfonamide, beispielsweise Sulanilamid, Sulfacarbamid und Sulfametoxydiazin und verwandte Derivate, Penicelline, beispielsweise 6-Aminopenicillansäure, Penicillin G sowie Penicillin V und verwandte Derivate, Isoxazoylpenicelline, wie Oxacillin, Cloxacillin und Flucloxacillin sowie verwandte Derivate,  $\alpha$ -substituierte Benzylpenicelline, wie Ampicillin, Carbenicillin, Pivampicillin, Amoxicillin und verwandte Derivate, Acylaminopenicelline, beispielsweise Mezlocillin, Azlocillin, Piperacillin, Apalocillin und verwandte Derivate, Amidinopenicilline, beispielsweise Mecillinam, atypische  $\beta$ -Lactame, wie Imipenam und Aztreonam, Cephalosporine, beispielsweise Cefalexin, Cefradin, Cefaclor, Cefadroxil, Cefixim, Cefpodoxim, Cefazolin,  
20 Cefazedon, Cefuroxim, Cefamandol, Cefotiam, Cefoxitin, Cefotetan, Cefmetazol, Latamoxef, Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftizoxim, Cefmonoxim, Ceftazidim, Cefsulodin und Cefoperazon sowie verwandte Derivate, Tetracycline, wie Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Demeclocyclin, Rolitetracyclin, Doxycyclin, Minocyclin und verwandte Derivate, Chloramphenicol, wie Chloramphenicol und Thiamphenicol sowie verwandte Derivate, Gyrasehemmstoffe, beispielsweise Nalixidinsäure, Pipemidsäure, Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin und Enoxacin sowie verwandte Derivate, und Tuberkulosemittel, wie Isoniazid und verwandte Derivate.  
30

Selbstverständlich kann im erfindungsgemäßen Konjugat pro Mol eine einzelne Pharmakonspezies (beispielsweise ein Pharmakon mit einem Zytostatikum als pharmazeutisch aktiver Substanz) oder unterschiedliche Pharmakonspezies (beispielsweise mehrere unterschiedliche Zytostatika oder ein Zytostatikum und ein Antiphlogistikum usw. als pharmazeutisch aktive Substanz) gebunden vorliegen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt das Spacermolekül einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigt- oder unverzweigt-kettigen aliphatischen Alkylrest mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen und/oder mindestens einen substituierten oder unsubstituierten Arylrest und/oder einen aliphatischen Kohlenstoffring mit 3 bis 12 Kohlenstoffatomen. Der aliphatische Alkylrest enthält vorzugsweise 1 bis 20 Kohlenstoffatome, die teilweise durch Sauerstoffatome ersetzt sein können, um beispielsweise die Wasserlöslichkeit zu erhöhen, wobei sich solche Reste vorzugsweise von einer Oligoethylenoxid- oder -propylenoxidkette ableiten. Besonders geeignete Reste, die von Oligoethylenoxid- oder -propylenoxidketten abgeleitet sind, umfassen beispielsweise Di-ethylenglycol-, Triethylenglycol- und Dipropylenglycolketten. Ein bevorzugter Arylrest ist ein unsubstituierter oder substituierter Phenylrest, bei welchem ebenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch Heteroatome ersetzt sein können. Bevorzugte Substituenten des aliphatischen Alkylrests bzw. des Arylrests sind hydrophile Gruppen, wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- und Hydroxygruppen.

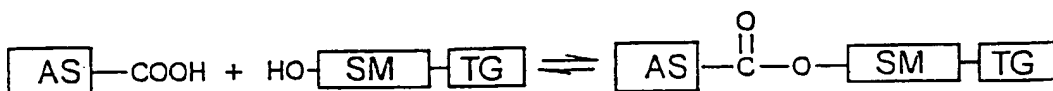
Bevorzugte diagnostisch wirksame Substanzen des erfindungsgemäßen Konjugats enthalten beispielsweise ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende, vorzugsweise solche Radionuklide komplexierende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, eine oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt die thiolbindende Gruppe eine Maleinimidgruppe, eine Halogenaceta-

midgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine Vinyl-carbonylgruppe, eine Aziridingruppe, eine Disulfidgruppe oder eine Acetylen-  
gruppe, die gegebenenfalls substituiert sind.

- 5 Das Pharmakon oder Pharmakaderivat der erfindungsgemäßen Konjugate kann je nach der vorliegenden funktionellen Gruppe gemäß einer der folgenden allgemeinen Beschreibungen hergestellt werden.

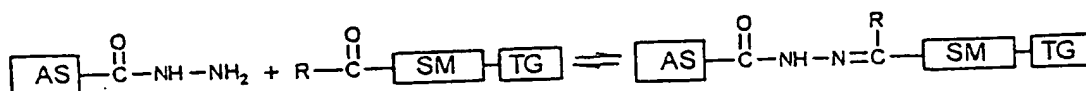
- 10 Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine HOOC-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



15

Die Veresterung erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

- 20 Es ist weiterhin möglich, die HOOC-Gruppe in eine Hydrazidgruppe zu überführen, z.B. durch Umsetzen mit tert.-Alkylcarbazaten und anschließende Spaltung mit Säuren (beschrieben in DE-A-196 36 889), und das eine Hydrazidgruppe aufweisende Pharmakon mit einer eine Carbonylkomponente enthaltenden Gruppe, bestehend aus der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül,  
25 umzusetzen, wie u.a. in DE-A-196 36 889 beschrieben ist:

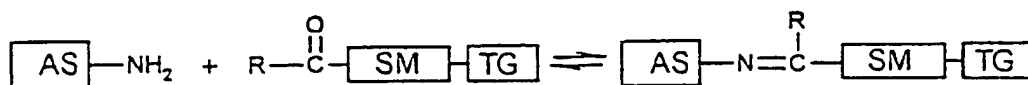


R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

30

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine

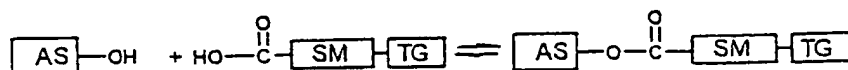
H<sub>2</sub>N-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



R = H, Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl

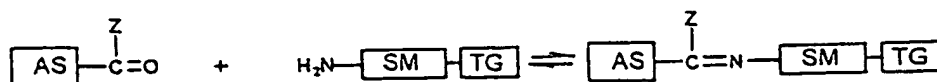
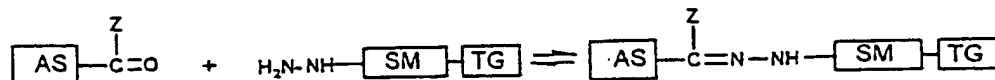
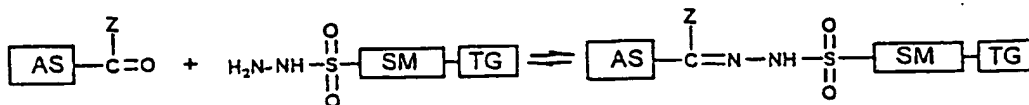
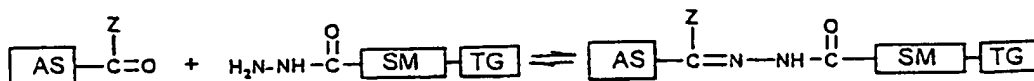
Die Reaktion zu den Iminderivaten erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine HO-Gruppe besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



Die Veresterung erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

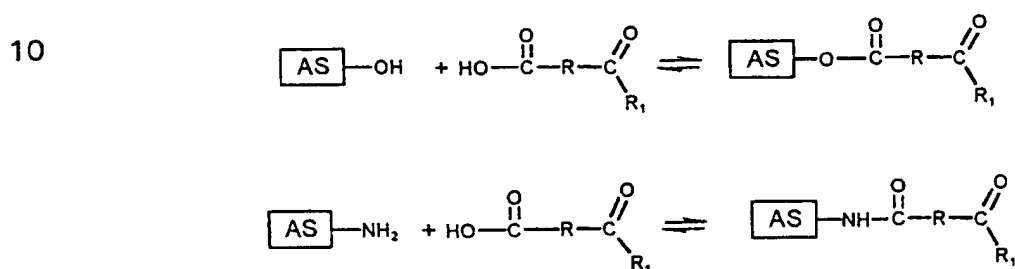
Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine Carbonylkomponente besitzen, können beispielsweise folgendermaßen derivatisiert werden:



Z = chemische Gruppe der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz

Die Umsetzung zu den Carboxyhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten erfolgt dabei durch im Stand der Technik bekannte Verfahren.

Es ist weiterhin möglich, eine HO-Gruppe oder eine NH<sub>2</sub>-Gruppe einer pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz in eine Carbonylkomponente zu überführen, beispielsweise durch eine Veresterung bzw. Amidbildung mit einer Carbonsäure-tragenden Carbonylkomponente gemäß den folgenden allgemeinen Reaktionsschemata,



15

wobei R eine aliphatische Kohlenstoffkette und/oder ein aliphatischer Kohlenstoffring und/oder ein Aromat und R<sub>1</sub> = H, Alkyl, eine unsubstituierte Phenylgruppe oder ein substituierter Phenylrest ist. R besteht vorzugsweise aus 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls substituiert, beispielsweise durch hydrophile Gruppen wie Sulfonsäure-, Aminoalkyl- oder Hydroxygruppen, sein können. Der Aromat ist vorzugsweise ein Benzolring, der gegebenenfalls substituiert sein kann. Bevorzugte Substituenten sind beispielsweise die vorstehend genannten hydrophilen Gruppen.

20

25

Die Carbonylkomponente kann des weiteren durch andere chemische Reaktionen eingeführt werden, beispielsweise durch eine elektrophile Substitution an der HO- oder NH<sub>2</sub>-Gruppe des Wirkstoffs mit einer geeigneten Carbonylkomponente.

30

Die derart derivatisierten Pharmaka, die nunmehr eine Carbonylkomponente aufweisen, werden analog zu den vorstehend beschriebenen Verfahren mit den Trägermolekül-bindenden Spacermolekülen, die eine Amino-, Hydrazid- oder Hydrazingruppe aufweisen, zu den entsprechenden Carboxylhydrazon-, Sulfonylhydrazon-, Hydrazon- bzw. Iminderivaten umgesetzt. Die Spaltung dieser säure-

labilen Bindungen führt demnach zu einer Freisetzung der derivatisierten pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz, die eine Carbonylkomponente aufweist.

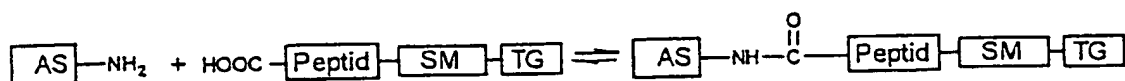
- 5 Die Gruppen, die aus der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül bestehen, können beispielsweise gemäß Verfahren, die u.a. in DE-A-196 36 889, U. Beyer et al., 1997 (*Chemical Monthly*, 128, 91, 1997), R.S. Greenfield et al., 1990 (*Cancer Res.*, 50, 6600, 1990), T. Kaneko et al., 1991 (*Bioconjugate Chem.*, 2, 133, 1991), Bioconjugate Techniques (G.T. Hermanson, Academic Press, 1996) oder im US-Patent 4,251,445 beschrieben sind, hergestellt werden.

- 15 Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die eine Peptidbindung enthalten, können beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß ein Peptid, das aus 2 bis etwa 30 Aminosäuren besteht, mit einer thiolbindenden Verbindung umgesetzt wird, so daß eine thiolbindende Gruppe direkt oder über ein Spacermolekül am N-terminalen Ende des Peptids eingeführt wird. Die Synthese von solchen Trägermolekül-bindenden Peptidderivaten erfolgt vorzugsweise durch eine einem Fachmann bekannte Festphasensynthese, wobei im
- 20 letzten Schritt des Peptidaufbaus ein Carbonsäure-tragendes, Trägermolekülbindendes Spacermolekül, z.B. eine Maleinimidcarbonsäure, durch Peptidkoppelung an das N-terminale Ende der Peptids gebunden und das Trägermolekülbindende Peptid anschließend von der Festphase abgespalten wird.

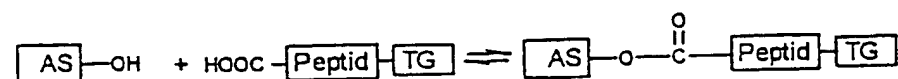
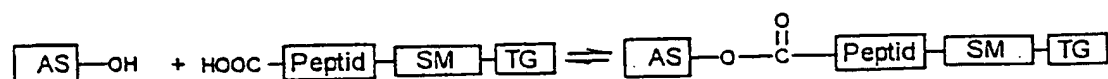
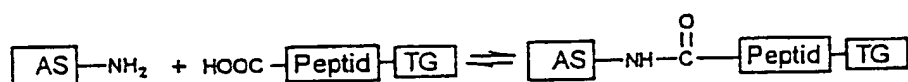
- 25 Die so erhaltenen Peptidderivate können mit Pharmaka oder Pharmakaderivaten, die eine H<sub>2</sub>N- oder HO-Gruppe besitzen, in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluol-sulfonat (CMC) oder (Benzotriazol-1-yloxy)-trispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (pyBOP) oder Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat,
- 30 und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder eines wasserlöslichen N-Hydroxysuccinimids, wie etwa des Natriumsalzes der N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure, oder 1-Hydroxybenzotriazol und/oder in Gegenwart einer

Base, beispielsweise N-Methylmorpholin oder Triethylamin, zu den entsprechenden thiolbindenden Pharmaka-Peptidderivaten umgesetzt werden:

5



10



15

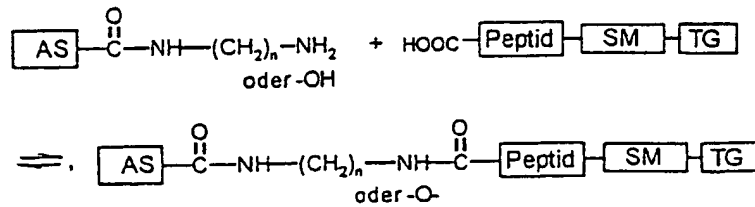
20

Es ist weiterhin möglich, über die HOOC-Gruppe der Pharmaka der erfindungsgemäßen Konjugate eine H<sub>2</sub>N- oder HO-Gruppe einzuführen, beispielsweise durch Derivatisierung über die  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäuren Lysin, Serin oder Threonin oder mit einer Diaminoverbindung der allgemeinen Formel H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> oder einem Alkoholamin der allgemeinen Formel H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH mit n = 1 bis 12, und diese Derivate im Anschluß mit den oben genannten Peptidderivaten zu den entsprechenden thiolbindenden Pharmaka-Peptidderivaten umzusetzen:

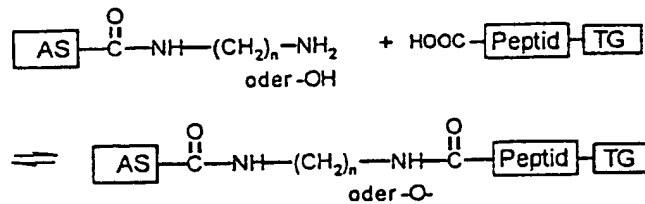
25



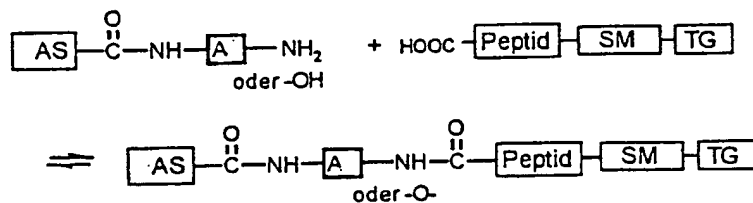
5



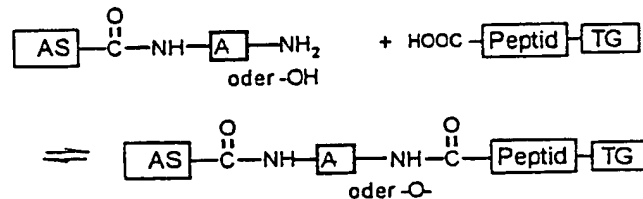
10



15



20



A = Lysin, Serin oder Threonin

25

Die Substratspezifität von Targetenzymen, wie etwa von MMP 2, MMP 3, MMP 9, Cathepsin B und H, ist bekannt (Netzel-Arnett et al. (1993), *Biochemistry* 32, 6427-6432, Shuja, S., Sheahan, K., Murnane, M.J. (1991), *Int.J.Cancer* 49, 341-346, Lah, T.T., Kos, J. (1998), *Biol. Chem.* 379, 125-130).

30

Beispielsweise sind Octapeptide ( $P_4 - P'_4$ ) für MMP 2 und MMP 9 (siehe Tabelle 1) identifiziert worden, welche die Spaltsequenz der Kollagenkette simulieren, und besonders effizient von MMP 2 und 9 gespalten werden (Aminosäuren sind

im folgenden entsprechend dem internationalen Dreibuchstabencode abgekürzt):

Tabelle 1:

5

Peptid

P<sub>4</sub> P<sub>3</sub> P<sub>2</sub> P<sub>1</sub> P'<sub>1</sub> P'<sub>2</sub> P'<sub>3</sub> P'<sub>4</sub>

Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln

Gly-Pro-Gln-Gly—Ile-Trp-Gly-Gln

10

(Netzel-Arnett et al., *Biochemistry* 32, 1993, 6427-6432)

Die Peptide werden ausschließlich an der P<sub>1</sub> - P'<sub>1</sub>-Bindung enzymatisch gespalten.

15

Desweiteren sind bei Cathepsin B substratspezifische Peptide bekannt mit der Sequenz -Gly-Phe-Leu-Gly-, -Gly-Phe-Ala-Leu-, -Ala-Leu-Ala-Leu-, -Arg-Arg- oder -Phe-Lys- (Werle, B., Ebert, E., Klein, W., Spiess, E. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 157-164; Ulrich, B., Spiess, E., Schwartz-Albiez, R., Ebert, W. (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 404-414).

20

Die Peptidsequenz, welche die für das Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle enthält, kann auch so aufgebaut sein, daß die Peptidsollbruchstelle mehrfach wiederholt wird, wie beispielsweise durch:

25

-Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly—Ile-Ala-Gly-Gln

oder

30

-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

oder es kann eine repetitive Peptidsequenz integriert werden, die den Abstand zwischen der thiolbindenden Gruppe und der relevanten Peptidsollbruchstelle vergrößert, wie beispielsweise durch:

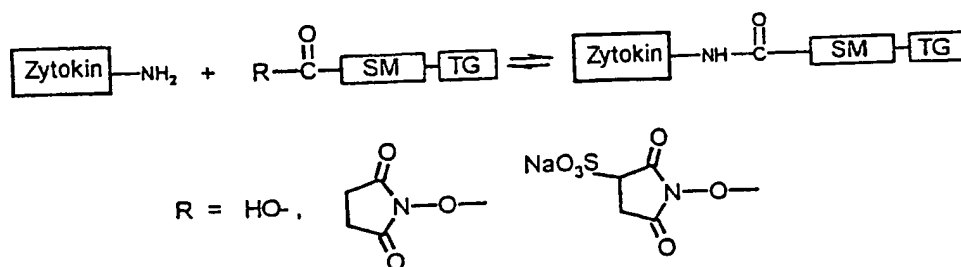
-(Gly)<sub>n</sub>-Phe-Lys-Phe-Lys-

mit vorzugsweise  $n = 2$  bis 20, mehr bevorzugt  $n \leq 12$ .

- 5 Ein wichtiges Merkmal dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist die Tatsache, daß die für das jeweilige Targetenzym relevante Peptidsollbruchstelle mindestens einmal in einem Oligopeptid, bestehend aus etwa 1 bis 30 Aminosäuren, vorkommt. Die oben aufgeführten Oligopeptide sind repräsentative Beispiele für die enzymatisch spaltbare Bindung in den erfindungsgemäßen
- 10 Konjugaten und schränken die Erfindung nicht ein.

Pharmaka oder Pharmakaderivate der erfindungsgemäßen Konjugate, die ein Zytokin enthalten, können beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß das Zytokin mit einem eine thiolbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das

15 eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäure aufweist, umgesetzt wird:



25

Weist das Spacermolekül eine N-Hydroxysuccinimidester-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid oder N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure, Natriumsalz) auf, wird es direkt mit dem Zytokin umgesetzt. Die Umsetzung des Zytokins mit einem eine thiolbindende Gruppe enthaltenen Spacermolekül, das eine Carbonsäure aufweist, erfolgt in der Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie zum Beispiel

30 N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat (CMC), und gegebenenfalls unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid oder dem Natriumsalz der N-Hydroxysuccinimid-3-sulfon-

säure, zu den entsprechenden thiolbindenden Zytokinderivaten. Die Aufreinigung der so derivatisierten Zytokine erfolgt in der Regel mit Hilfe der Ausschlußchromatographie. Die oben beschriebenen Umsetzungen sind einem Fachmann geläufig (siehe z.B. Bioconjugate Techniques, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996).

Die oben beschriebenen Pharmaka oder Pharmakaderivate werden an einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten wie beispielsweise natives oder rekombinantes Albumin, gekoppelt, so daß im erfindungsgemäßen Konjugat pro Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind. Enthält die Polypeptidsequenz des Trägers  $n$  (beispielsweise 3) Cystein-Reste, so bedeutet dies, daß 1 Mol dieses Trägers  $n$  (beispielsweise 3) Mol Cystein-Reste enthält und daher pro Mol des entsprechenden Konjugats maximal  $n$  (beispielsweise 3) Mol Pharmakon an den Träger gebunden vorliegen können. Im Idealfall sind im erfindungsgemäßen Konjugat daher 100% der im Träger vorhandenen Cystein-Reste über die thiolbindende Gruppe mit einem Pharmakon verbunden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung eines wie oben definierten Konjugats, umfassend

- (i) Behandlung des Trägers mit einem Reduktionsmittel, so daß mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger vorliegen und
- (ii) Kopplung des Pharmakons über die thiolbindende Gruppe an die Cystein-SH-Gruppen im Träger.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das zur Behandlung des Trägers verwendete Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) oder Mercaptoethanol. Das besonders bevorzugte Reduktionsmittel ist DTT.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß die im Stand

der Technik bekannten Träger in einem inhomogenen Oxidationsstatus vorliegen. Beispielsweise lassen sich im Fall des im Handel erhältlichen nativen Albumins in der Regel mit dem photometrischen Essay nach Ellmann  $\approx 0,2$  bis  $0,7$  Mol HS-Gruppen pro Mol Cystein-Reste im Albumin nachweisen, d.h. das Cystein-34 ist häufig durch schwefelhaltige Verbindungen, wie etwa Cystein oder Glutathion, über eine Disulfidbindung oxidiert. Das bedeutet, daß die im Albumin vorhandenen Cystein-SH-Gruppen zumindest häufig nicht frei vorliegen, was bisher dazu führte, daß die Ausbeute an hergestellten Konjugaten zu gering und/oder stark schwankend von Albumin- zu Albumincharge war.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß im Handel erhältliche Träger mit einem Reduktionsmittel behandelt werden können, wobei die durch Disulfidbindungen oxidierten Cysteingruppen reduziert werden, so daß mehr als  $0,7$  Mol Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Reste im Träger vorliegen. Die Reaktion wird vorzugsweise so gesteuert, daß mindestens  $0,9$  Mol Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger verfügbar werden.

Die Umsetzung des Reduktionsmittels mit einem im Handel erhältlichen Träger, z.B. Albumin, erfolgt beispielsweise in einem Salzpuffer, z.B. in  $0,01$  M Natriumborat,  $0,15$  M NaCl,  $0,001$  M EDTA oder  $0,15$  M NaCl,  $0,004$  M Phosphat in einem pH-Bereich von  $5,0$  bis  $8,0$ , vorzugsweise von  $6,0$  bis  $7,0$ . Das Reduktionsmittel kann im Überschuß eingesetzt werden, vorzugsweise ist das Verhältnis von Reduktionsmittel zu Träger zwischen  $0,5:1$  und  $10:1$ . Die Reaktionszeit beträgt zwischen  $1$  h und  $96$  h, vorzugsweise zwischen  $6$  h und  $24$  h.

Der mit dem Reduktionsmittel behandelte Träger wird z.B. durch Gelfiltration (beispielsweise Sephadex® G10 oder G25, Laufmittel:  $0,004$  M Phosphat,  $0,15$  M NaCl - pH  $7,4$ ) oder durch Ultrafiltration isoliert.

Die Konzentration an Träger nach erfolgter Gelfiltration wird durch den Extinktionskoeffizienten bei  $280$  nm, die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen wird mit Ellmann's Reagenz bei  $412$  nm bestimmt. Die so isolierte Trägerlösung kann direkt für die Synthese der Konjugate eingesetzt werden. Es ist auch möglich,

die Trägerlösung mit einem handelsüblichen Konzentrator aufzukonzentrieren oder zu lyophilisieren. Die isolierte Trägerlösung oder das Lyophilisat kann im Temperaturbereich von  $-78$  bis  $+30$  °C gelagert werden.

- 5 Die Kopplung der oben beschriebenen Pharmakaderivate an den Träger erfolgt beispielsweise bei Raumtemperatur. Dabei wird zu dem Träger, der sich in einem Salzpuffer (beispielsweise 0,15 M NaCl - pH 6,0 bis 8,0), der eventuell vorher entgast wurde, befindet, ein etwa 1,1- bis 10-facher Überschuß des wie oben
- 10 beschrieben hergestellten Pharmakons (bezogen auf die Anzahl der vorhandenen HS-Gruppen im Träger), gelöst in einer minimalen Menge Lösungsmittel, beispielsweise DMF, Dimethylsulfoxid, Wasser, Salzpuffer, Ethanol, Methanol, Propylenglykol, Glycerin, Acetonitril oder THF (etwa 1 bis 10% des Volumens der Trägerprobe), gegeben. Es ist auch möglich, das Pharmakon als Festsubstanz
- 15 zur Trägerlösung zu geben. Desweiteren kann es vorteilhaft sein, vor der Kopplung einen Hilfsstoff, wie etwa eine Fettsäure oder ein Tryptophonatderivat, zur Trägerlösung zu geben. Nach einer Reaktionszeit zwischen 5 min und 48 h wird die Lösung, falls erforderlich, zentrifugiert, und das gebildete Träger-Pharmakon-
- 20 Konjugat wird durch anschließende Gelfiltration (beispielsweise Sephadex® G10 oder G25) in einem Salzpuffer, wie etwa 0,004 M Phosphat, 0,15 M NaCl - pH 6,0 bis 8,0, isoliert.

- Die Reinheit des entstandenen Konjugats kann beispielsweise durch HPLC, z.B. durch Außschlußchromatographie, überprüft werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Konjugaten weisen die gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des
- 25 erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Konjugate eine Reinheit von mehr als 95% auf.

- Die Lösung des so erhaltenen Konjugats kann mit einem handelsüblichen Konzentrator aufkonzentriert werden. Die Konjugate können in gelöster Form bei  $+1$
- 30 bis  $+30$  °C oder in gefrorener Form bei  $T = 0$  °C bis  $-78$  °C gelagert werden. Desweiteren ist es möglich, die Lösung der Konjugate zu lyophilisieren und das Lyophilisat bei  $+30$ ° bis  $-78$  °C zu lagern.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Arzneimittel, enthaltend ein wie oben definiertes Konjugat, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Hilfsstoff und/oder ein Verdünnungsmittel. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann bevorzugt zur Behandlung von Krebskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren oder Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien und/oder Pilze verursacht sind, verwendet werden.

Noch eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, enthaltend ein wie oben definiertes Konjugat. Der erfindungsgemäße diagnostische Kit kann bevorzugt zum Nachweis der wie vorstehend definierten Erkrankungen und/oder zum Nachweis von Molekülen des Trägers und/oder deren Verteilung im Körper verwendet werden.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 (A) ist ein HPLC-Chromatogramm eines erfindungsgemäßen Konjugats (A-DOXO-HYD-C). Es ist die Absorption bei 495 nm gegen die Retentionszeit in min aufgetragen. (B) ist das entsprechende HPLC-Chromatogramm von im Handel erhältlichem nativem Albumin (Immuno GmbH).

Fig. 2 zeigt HPLC-Chromatogramme (Ausschlußchromatographie-Säule Biosil 250 SEC der Fa. Biorad) eines erfindungsgemäßen Konjugats (HSA-Cys<sup>34</sup>-2), welches durch die Matrixmetalloprotease MMP 9 spaltbar ist. Es ist jeweils die Absorption bei 495 nm gegen die Retentionszeit in min aufgetragen. (A) Chromatogramm des Konjugats HSA-Cys<sup>34</sup>-2 vor der Inkubation mit MMP 9 (t=0). (B) Chromatogramm des Konjugats HSA-Cys<sup>34</sup>-2 nach der Inkubation mit MMP 9 für 30 min (t=30 min).

Fig. 3 zeigt die graphische Darstellung der Gewichte und Volumen von Nieren und Nierentumoren (A) sowie der Gewichte von Lungen und die Anzahl der Lungenmetastasen (B) von Mäusen, bei denen ein Nierenkarzinom erzeugt wurde, und die den angegebenen Behandlungen ausgesetzt wur-

den (Kontrolle: keine Behandlung; Albumin-Kontrolle: natives Albumin; Doxo: Doxorubicin; A-DOXO-HYD-C: erfindungsgemäßes Konjugat). Zum Vergleich sind auch die Daten für Mäuse, denen keine Tumorzellen injiziert wurden, abgebildet (kein Tumor).

5

Das folgende Beispiel erläutert die vorliegende Erfindung näher, ohne sie einzuschränken.

#### BEISPIEL

10

#### Umsetzung von humanem Serumalbumin (HSA) mit Dithiothreitol (DTT)

Das Verfahren für die Behandlung von HSA mit einem Reduktionsmittel wird durch folgendes Beispiel genauer dargestellt: 2,0 g humanes Serumalbumin (10 ml einer 20%igen HSA-Lösung, Pharma Dessau) wird mit 10 ml Puffer A (0,004 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl - pH 7,0) verdünnt und mit 100  $\mu$ l einer frisch hergestellten  $0,036 \times 10^{-2}$  M DTT-Lösung (5,55 mg DTT gelöst in 100  $\mu$ l Puffer A) versetzt und das Reaktionsgefäß sanft unter Luftausschluss während 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Albuminlösung durch Gelfiltration (Säule 5,0 cm x 25,0 cm, Sephadex® G.25; Laufpuffer 0,004 M Natriumphosphat, 0,15 M NaCl - pH 7,4) aufgereinigt. Die Proteinkonzentration nach erfolgter Gelfiltration wurde photometrisch bei 280 nm ( $\epsilon(\text{HSA})_{280} = 35\,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  -  $c[\text{HSA}] \approx 3,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) und die Anzahl der eingeführten HS-Gruppen mit Ellmanns Reagenz bei 412 nm ( $\epsilon_{412} = 13\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  -  $c[\text{HS-Gruppen}] \approx 3,07 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) bestimmt. Daher liegen im so behandelten HSA 0,99 Mol freie Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest vor. Das behandelte HSA wurde auf etwa  $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$  eingengt (Centriprep-10®) und direkt für die unten aufgeführte Kopplungsreaktion mit einem thiolbindenden Pharmakon der vorliegenden Erfindung verwendet.

30

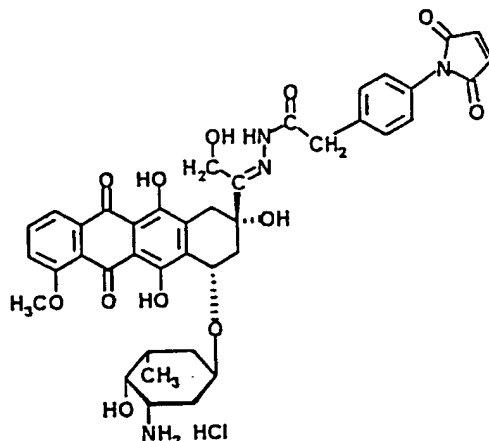
#### Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats A-DOXO-HYD-C

Das HSA-Doxorubicin-Konjugat (A-DOXO-HYD-C), bestehend aus gemäß obigem



Beispiel mit DTT behandeltem HSA und einem Maleinimidophenyllessigsäurehydrazon-Derivat von Doxorubicin (DOXO-HYD), wurde weiterhin folgendermassen hergestellt.

5 Struktur von DOXO-HYD:



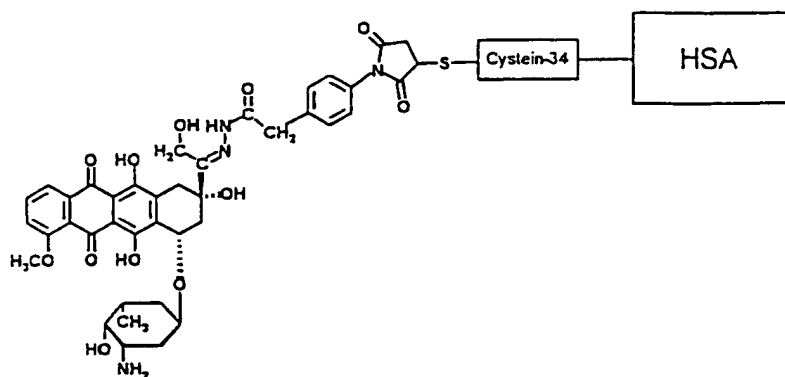
12 ml der mit DTT behandelten HSA-Probe (Sulfhydrylgehalt von 0,99 Mol pro Mol HSA) wurden mit 0,6 ml einer Lösung von DOXO-HYD (Mr 807,8) in DMF (12,5 mg gelöst in 0,6 ml DMF) versetzt und die Reaktionslösung während 18 h sanft geschüttelt. Das entstandene HSA-Doxorubicin-Konjugat wurde über eine Sephadex® G-25F Säule (Säule 5,0 cm x 25 cm) isoliert (Retentionsvolumen: 85 - 135 ml). Die Menge an gebundenem Doxorubicin wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Doxorubicin bei 495 nm ( $\epsilon_{495} = 10\,650\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  bei pH 7,4) bestimmt. Danach sind in diesem Beispiel pro Mol Cystein-Rest im HSA 0,97 Mol Doxorubicin an das HSA gebunden.

*Methoden-* FPLC für die Herstellung der Konjugate: P-500 pump, LCC 501 Controller (Pharmacia) und LKB 2151 UV-Monitor. Die Proteinkonzentration des Konjugats wurde photometrisch sowie mit dem BCA-Protein-Essay von Pierce (USA) bestimmt.

Die Reinheit des Konjugats A-DOXO-HYD-C wurde durch HPLC mit Hilfe einer analytischen Säule (Bio-Sil SEC 250, (300 mm x 7.8 mm) von Bio-RAD (mobile Phase: i.d.R. 0.15 M NaCl, 0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  - pH 7.0) bei  $\lambda =$

495 nm geprüft. Die HPLC-Chromatogramme für A-DOXO-HYD-C und von im Handel erhältlichem nativem Albumin (Immuno GmbH) sind in der Fig. 1A (A-DOXO-HYD-C) und der Fig. 1B (natives Albumin) abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, daß A-DOXO-HYD-C eine dem im Handel erhältlichen nativen Albumin vergleichbare, hervorragende Reinheit aufweist.

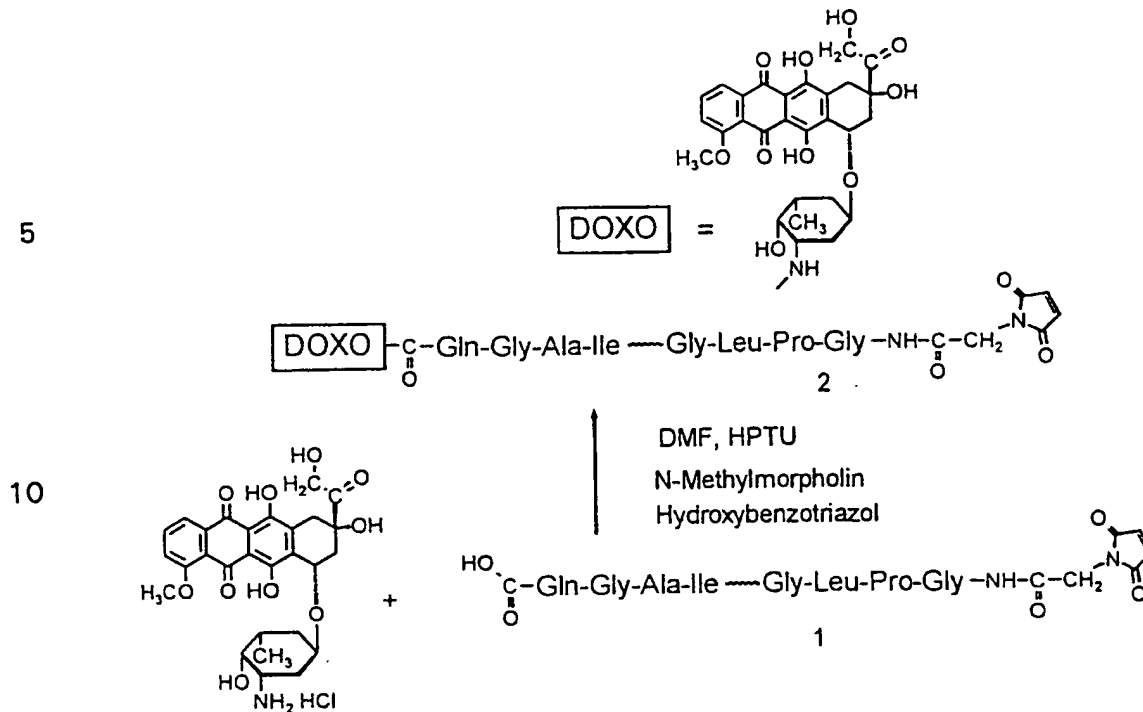
Struktur von A-DOXO-HYD-C:



(HSA = humanes Serumalbumin)

Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats, bestehend aus mit DTT behandeltem HSA und einem durch MMP 9 spaltbaren Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivat

Das Doxorubicin-Maleinimid-Peptid-Derivat (2) wurde gemäß folgender Reaktionsgleichung hergestellt.

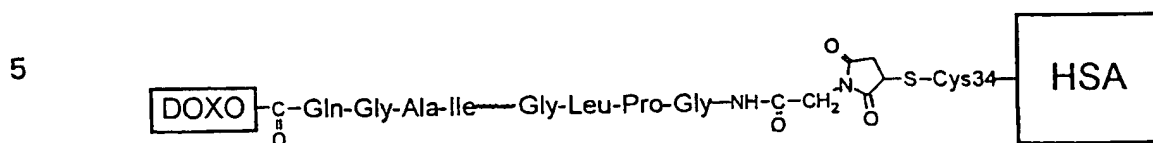


Dabei wurde das mit Maleinimidoglycin derivatisierte Octapeptid Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly 1 (Mr 848, hergestellt durch Festphasensynthese durch Bachem AG, Schweiz) mit Doxorubicin gemäß dem folgenden Verfahren umgesetzt:

20 Zu einer leicht trüben Lösung von 17,1 mg Doxorubicin in 3 ml DMF werden 25 mg 1 (als Trifluoracetatsalz), gelöst in 500  $\mu$ l DMF, 33,5 mg O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HPTU), gelöst in 200  $\mu$ l DMF, 11,9 mg Hydroxybenzotriazolhydrat, gelöst in 100  $\mu$ l DMF, und 16,2  $\mu$ l N-Methylmorpholin zugegeben und der Ansatz anschließend 18 h lang bei RT in der Dunkelheit gerührt. DMF wurde unter Hochvakuum entfernt und der Feststoff in 20 ml Methanol aufgenommen, filtriert und im Vakuum auf 1 ml eingeeengt. Nach Aufreinigung über Kieselgel (Essigester/Methanol 2/1) wurden 5 mg 2 erhalten.

30 3,0 ml einer mit DTT behandelten HSA-Probe (Sulfhydrylgehalt von 0,95 pro HSA-Molekül, Gehalt an HS-Gruppen  $\sim 1000 \mu$ M) wurden mit einer Lösung von 2 (Mr 1374) in DMF (5,1 mg, gelöst in 250  $\mu$ l DMF) versetzt und die Reaktionslösung während 30 min sanft geschüttelt. Das entstandene Albumin-Doxorubicin-Konjugat wurde über eine Sephacryl® HR100-Säule (2,0 cm x 20

cm) isoliert. Auf diese Weise wurde das Albuminkonjugat (im folgenden mit HSA-Cys<sup>34</sup>-2 bezeichnet) der folgenden Struktur isoliert (Beladungsfaktor ~0,9):



HSA = humanes Serumalbumin

10

Die Peptidsequenz Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly wird von der Matrixmetalloprotease MMP 9 erkannt und zwischen Isoleucin und Glycin gespalten. Dies wurde durch folgenden Versuch gezeigt: 200  $\mu$ l einer 100  $\mu$ M Lösung von HSA-Cys<sup>34</sup>-2 wurde mit Trypsin/Aprotinin-aktivierter MMP 9 (2 mU, erhalten von Calbiochem, Deutschland) 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Freisetzung von DOXO-Gln-Gly-Ala-Ile aufgrund der Spaltung mit MMP 9 wurde durch HPLC-Ausschlußchromatographie (Biosil 250 SEC Säule der Fa. Biorad, Detektion bei  $\lambda$  = 495 nm) vor der Inkubation (t = 0, vgl. Fig. 2A) und nach einer Inkubationszeit mit aktivierter MMP 9 von 30 Minuten (t = 30, vgl. Fig. 2B) bestätigt.

20

### Biologische Untersuchungen

Als Beispiel für die *in vivo* Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate werden die biologischen Daten der HSA-Doxorubicin-Konjugats A-DOXO-HYD-C aufgeführt.

25

Im sogenannten RENCA (renal cell carcinoma)-Modell wurden Doxorubicin und das erfindungsgemäße Konjugat A-DOXO-HXD-C hinsichtlich der antitumoralen Wirksamkeit bei annähernd äquitoxischer Dosis miteinander verglichen (intravenöse Therapie 10 Tage nach Injektion von etwa 1 Million Nierenkarzinomzellen in die linke Niere).

30

**Tiere:** Balb/c- Mäuse, weiblich; **Tumor:** RENCA, renal cell carcinoma

**Therapie:** Tag(d) 10, 14, 18, 21 intravenös (i.v.), Ende des Versuchs: d 25

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

5

Tabelle 2

	Anzahl der Mäuse	Substanz	Dosis (mg/Kg/inj.)	Mortalität (d)	Durchschnittliche Körpergewichts- abnahme (%) d 1 bis 25
10	10	Kontrolle		2	- 14
	10	Albumin-Kontrolle	4x1,4 g	1	- 16
	10	Doxorubicin (Doxo)	4x6 mg/kg	1	- 21
	10	A-DOXO-HYD-C	4x12 mg/kg	0	- 18

15 Die Dosis bezieht sich auf die vorhandene Menge Doxorubicin. Die Dosierungen von Doxorubicin und A-DOXO-HYD-C sind annähernd äquitoxisch (siehe Körpergewichtsabnahme in der Tabelle 2).

20 Die Ergebnisse dieses Versuches sind desweiteren in der Fig. 3 hinsichtlich der Gewichte und Volumina der Nieren und Nierentumoren (Fig. 3A) sowie der Gewichte der Lungen und der Anzahl der Lungenmetastasen (Fig. 3B) graphisch dargestellt. A-DOXO-HYD-C zeigt eine sehr gute antitumorale Wirksamkeit und erzielt eine komplette Remission in allen Tieren. Makroskopisch sichtbare Lungenmetastasen konnten nur in einem Tier beobachtet werden (Fig. 3B). Bei der

25 mit Doxorubicin behandelten Gruppe wurden deutlich sichtbare Nierentumoren in allen Tieren beobachtet (Fig. 3A), d.h. bei der optimalen Dosis von Doxorubicin (Körpergewichtsabnahme: -21 % (d 1 bis 25); 1 Tier verstorben) konnten demgegenüber keine kompletten Remissionen erzielt werden. Weiterhin betrug bei den mit freiem Doxorubicin behandelten Mäusen die Anzahl der Lungenmeta-

30 stasen im Durchschnitt etwa 100 Metastasen pro Maus (Fig. 3B).

### Ansprüche

1. Träger-Pharmakon-Konjugat, umfassend einen Träger, enthaltend eine Polypeptidsequenz mit einem oder mehreren Cystein-Resten, und ein Pharmakon, enthaltend eine pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktive Substanz, ein Spacermolekül und eine thiolbindende Gruppe, wobei pro  
5 Mol Cystein-Rest mehr als 0,7 Mol Pharmakon über die thiolbindende Gruppe an den Träger gebunden sind.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Träger natives oder rekombinantes Albumin ist.  
10
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der pharmazeutisch und/oder diagnostisch aktiven Substanz und dem Spacermolekül und/oder die Verknüpfung zwischen der thiolbindenden Gruppe und dem Spacermolekül hydrolytisch und/oder pH-  
15 abhängig und/oder enzymatisch spaltbar ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine Peptidbindung enthält.
- 20 5. Konjugat nach Anspruch 4, wobei die Peptidbindung innerhalb einer Peptidsequenz vorliegt, welche mindestens eine Spaltsequenz einer Protease enthält.
- 25 6. Konjugat nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei das Spacermolekül und/oder die Verknüpfung mindestens eine säurelabile Bindung enthält.

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die pharmazeutisch aktive Substanz ein Zytostatikum, ein Zytokin, ein Immunsuppressivum, ein Antirheumatikum, ein Antiphlogistikum, ein Antibiotikum, ein Analgetikum, ein Virostatikum oder ein Antimykotikum ist.

5

8. Konjugat nach Anspruch 7, wobei das Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline, der N-Nitrosoharnstoffe, der Alkylantien, der Purin- oder Pyrimidinantagonisten, der Folsäureantagonisten, der Taxane, der Camptothecine, der Podophyllotoxinderivate, der Vinca-Alkaloide, der Calicheamidine, der Maytansinoide oder der *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexe ausgewählt ist.

10

9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die diagnostisch wirksame Substanz ein oder mehrere Radionuklide, ein oder mehrere Radionuklide umfassende Liganden, ein oder mehrere Positronenstrahler, ein oder mehrere NMR-Kontrastmittel, eine oder mehrere fluoreszierende Verbindung(en) oder ein oder mehrere Kontrastmittel im nahen IR-Bereich enthält.

15

10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die thiolbindende Gruppe eine Maleinimidgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Pyridyldithio-Gruppe, eine Vinylcarbonylgruppe, eine Aziridingruppe, eine Disulfidgruppe oder eine Acetylengruppe umfaßt, die gegebenenfalls substituiert sind.

20

25

11. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Spacermolekül einen substituierten oder unsubstituierten, verzweigt- oder unverzweigt-kettigen aliphatischen Alkylrest mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen und/oder mindestens einen substituierten oder unsubstituierten Arylrest und/oder einen aliphatischen Kohlenstoffring mit 3 bis 12 Kohlenstoffatomen umfaßt.

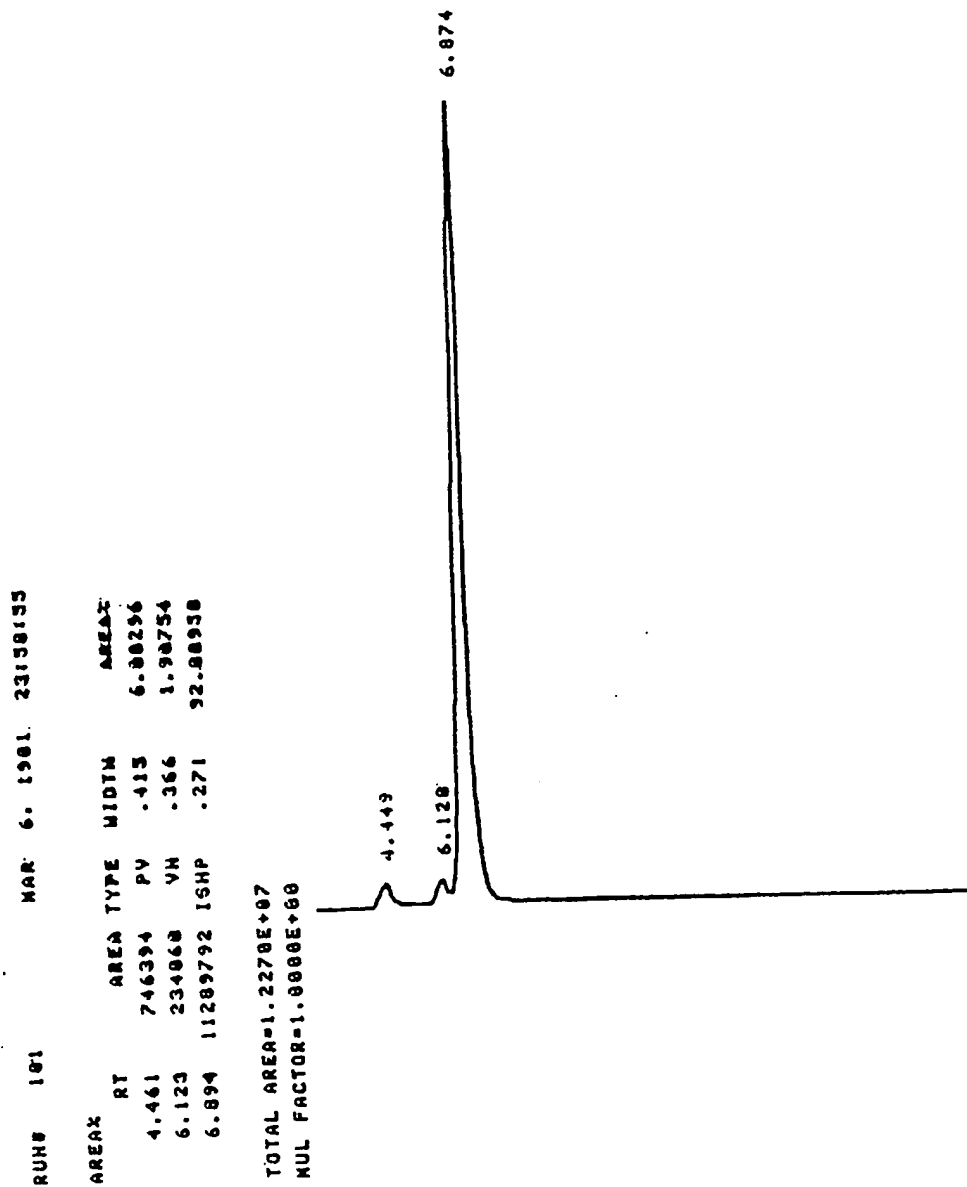
30

12. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend
- 5 (i) Behandlung des Trägers mit einem Reduktionsmittel, so daß mehr als 0,7 Mol, vorzugsweise mindestens 0,9 Mol, Cystein-SH-Gruppen pro Mol Cystein-Rest im Träger vorliegen und
- (ii) Kopplung des Pharmakons über die thiolbindende Gruppe an die Cystein-SH-Gruppen im Träger.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das Reduktionsmittel Dithiothreitol, Dithioerythritol oder Mercaptoethanol ist.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei das hergestellte Konjugat eine Reinheit von mehr als 95% aufweist.
- 15 15. Arzneimittel, enthaltend das Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder einen Hilfsstoff und/oder ein Verdünnungsmittel.
- 20 16. Arzneimittel nach Anspruch 15 zur Behandlung von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden.
- 25 17. Diagnostischer Kit, enthaltend das Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
- 30 18. Kit nach Anspruch 17 zum Nachweis von Krebskrankheiten, Autoimmunkrankheiten, akuten oder chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Erkrankungen, die durch Viren und/oder Mikroorganismen verursacht werden, und/oder von Molekülen des Trägers und/oder deren Verteilung im Körper.



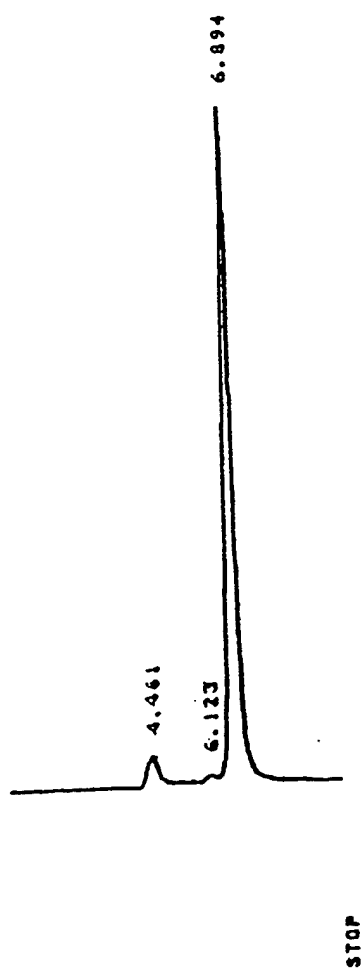
1/4

Fig. 1A



2/4

Fig. 1B



3/4

Fig. 2A

t = 0 min

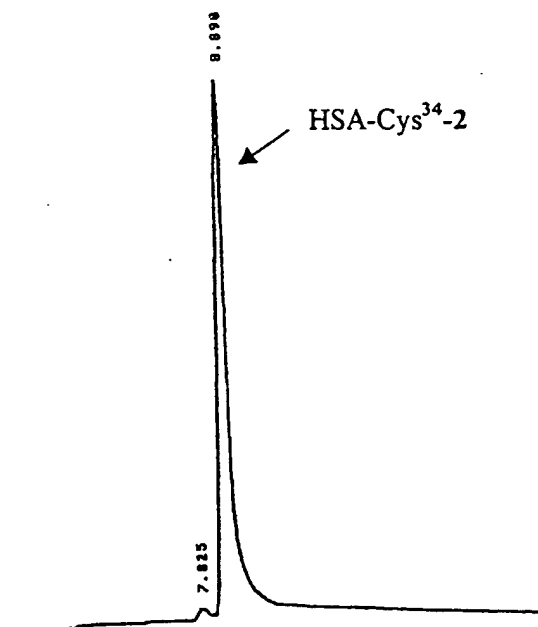
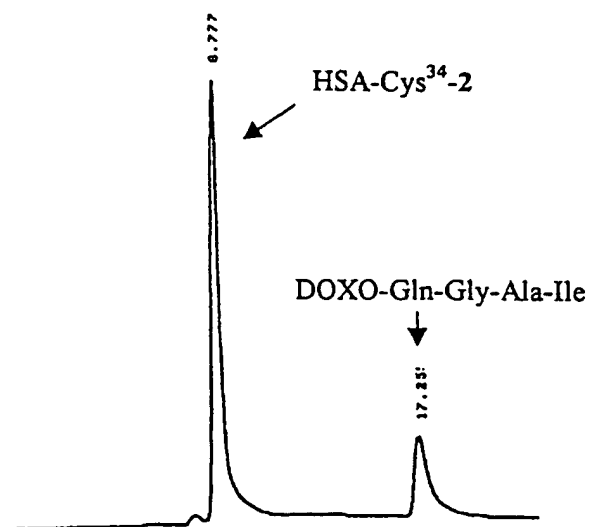


Fig. 2B

t = 30 min



4/4

Fig. 3A

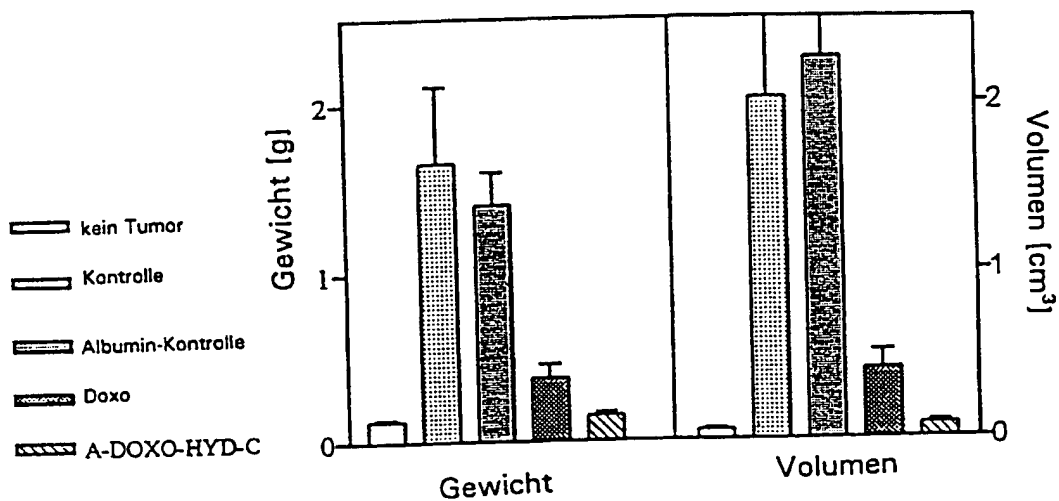
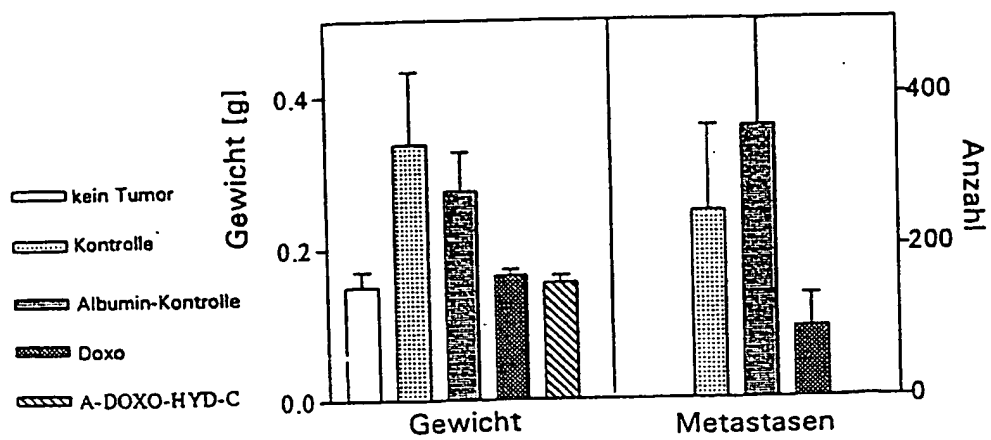


Fig. 3B



International Publication No. WO 00/76550 A2

---

Job No.: 6155-81488

Translated from German by the Ralph McElroy Translation Co.  
910 West Avenue, Austin, Texas 78701

INTERNATIONAL PATENT OFFICE  
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

International patent published on  
the basis of the Patent Cooperation Treaty (PCT)  
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 00/76550 A2

International Patent Classification <sup>7</sup> :	A 61 K 47/48
International Filing No.:	PCT/EP00/05254
International Filing Date:	June 7, 2000
International Publication Date:	December 21, 2000
Language Submitted in:	German
Language Published in:	German
Priority	
Date:	June 10, 1999
Country:	Germany
No.:	199 26 475.9

CARRIER-DRUG CONJUGATES

Inventor/Applicant (only for US):	Felix Kratz, Zum Abtsweingarten 19, D-79241 Ihringen, Germany
Applicant (for all contracting states except US):	KTB Tumorforschungs GmbH, Breisacher Strasse 117, D-79106 Freiburg, Germany
Agent:	Ralf Perrey; Müller-Boré & Partner Grafinger Strasse 2, D-81671 Munich, Germany
Contracting States (national):	AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,

LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,  
MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW.

Contracting States (regional)):

ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS,  
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European Patent (AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published with International Search Report. Before expiration of the period permitted for amendments to the claims. Will be republished if amendments are submitted.

For an explanation of the two letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

### Abstract

The invention relates to carrier-drug conjugates comprising a carrier, which contains a polypeptide sequence with one or several cysteine residues, and a drug, which contains a pharmaceutically and/or diagnostically active substance, a spacer molecule, and a thiol-binding group, wherein more than 0.7 mol of the drug per mol of cysteine residue is bound to the carrier via the thiol-binding group, as well as methods for the production thereof and drugs and diagnostic kits containing said conjugates.

### Description

The present invention relates to carrier-drug conjugates and methods for the production thereof and drugs containing the conjugates.

The majority of the drugs presently used are low-molecular compounds which, after systemic administration, have a high plasma as well as total clearance. Furthermore, as a result of diffusion processes, they penetrate the tissue structures of the body and, as a rule, show a uniform biodistribution. These two properties are responsible for the fact that only small quantities of the drug reach the site of action and that the drug, due to its distribution into the

healthy tissue of the body, provokes side effects. These drawbacks are especially pronounced in drugs with a high cytotoxic potential, such as cytostatics or immunosuppressants.

For this reason, new derivatives and formulations are needed which make a more selective treatment possible. For this purpose, immunochemical conjugates and protein or polymer conjugates comprising a suitable carrier substance and a drug have been developed.

In this field, prior-art polymer conjugates are known in which cytostatics are bound to serum proteins, antibodies, growth factors, hormone- and peptide-like structures or to synthetic polymers (M. Mägerstädt: Antibody Conjugates and Malignant Disease, Library of Congress 1990; L. W. Seymour, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. (1992), 9, pp. 135-187; H. Maeda and Y. Matsumura, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. (1989), 6, pp. 193-210).

From the German Patent Application No. DE-A-41 22 210, it is known that there are conjugates of tumor-active compounds with albumin wherein the tumor-active compound is activated with N-hydroxysuccinimide and carbodiimide, and the mixture thus obtained is bound directly to the carrier protein. Among other things, the disadvantages of these conjugates relate to the fact that it is not possible to obtain them in the high purity required, that often, due to the methods of production, the native structure of the albumin is retained, and that the stoichiometric ratio between the drug and the albumin is not constant and cannot be reproduced well. In addition, it is not possible to release these conjugates in a suitable manner in the target tissue and in the target cells.

Thus, the problem to be solved by the present invention is to make available new carrier-drug conjugates which do not have the disadvantages of the conjugates known from prior art.

This problem is solved by the embodiments of the present invention that are characterized in the claims below.

Specifically, this invention makes available a carrier-drug conjugate comprising a carrier, which contains a polypeptide sequence with one or several cysteine residues, and a drug which contains a pharmaceutically and/or diagnostically active substance, a spacer molecule, and a thiol-binding group, wherein, per mol of cysteine residue, more than 0.7 mol, preferably a minimum of 0.9 mol, of the drug are bound to the carrier via the thiol-binding group. In this context, the term "pharmaceutically active substance" is defined to mean that the specific substance, either by itself or after it has been converted by the metabolism of the organism, provokes a pharmacological effect and thus includes any derivatives that might be produced by these conversions. It goes without saying that the pharmaceutically active substance can have a specific single pharmacological activity (for example, cytostatic) or a broad pharmacological activity spectrum (for example, cytostatic and antiphlogistic, etc.). The term "diagnostically active substance" is defined to mean that the substance can be identified and preferably

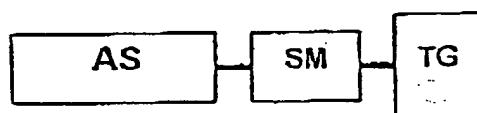


quantified in the organism or parts thereof, such as cells, and/or fluids, such as serum, by means of suitable chemical and/or physical analytical methods.

The release of the pharmaceutically active substance is to be preferred since, as a rule, the low-molecular active ingredient must interact with the target molecule in order to be able to develop its pharmacological efficacy. In diagnostically active substances, a release of the diagnostic agent that is bound to the carrier molecule is, as a rule, not necessarily required although such a release may be provided for. Therefore, according to the present invention, a diagnostically active substance can be additionally bound to the spacer molecule either via a bond that is not cleavable in the body or it can be bound directly to the group that binds the carrier molecule.

According to a preferred embodiment of the conjugate according to the present invention, the carrier is native or recombinant albumin.

The drug or the drug derivative in the conjugate according to the present invention can be represented, for example, by the following schematic pattern (AS, pharmaceutically and/or diagnostically active substance; SM, spacer molecule; TG, thiol-binding group):



The conjugate according to the present invention is a transporting and/or depot version of the pharmaceutically and/or diagnostically active substance which makes it possible for the drug to reach the target cells or the target tissue in a targeted and/or metered manner. In contrast to the conjugates known so far, the conjugates according to the present invention can be obtained in a greater purity, the native structure of the carrier is retained, and the stoichiometric ratio between the drug and the carrier is constant and reproducible.

In contrast to the albumin-cytostatic conjugates described in the German Patent Application No. DE-A-41 22 210, the conjugate according to the present invention has the additional advantage that between the pharmaceutically and/or diagnostically active substance and the thiol-binding group, there is a spacer which is tailored to ensure that the pharmaceutically and/or diagnostically active substance or a relevant derivative thereof can be hydrolytically and/or pH-dependently and/or enzymatically released in the target tissue or in the target cells.

Carriers, such as albumin, and/or the drug conjugates of said carriers have an extremely long half-life in the systemic circulatory system (up to 19 days according to T. Peters, Jr. (1985): Serum albumin. Adv. Protein. Chem. 37, pp. 161-245). Due to an increased permeability of the

vascular walls of malignant, infected, or inflamed tissue for macromolecules, the carrier, for example, serum albumin, moves specifically into this target tissue (H. Maeda and Y. Matsumura. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1989), 6, pp. 193-210). As a result, an active ingredient that is bound to a carrier, for example, albumin can more specifically reach the site of action. In addition, the carrier-drug conjugate according to the present invention ensures that a diffusion of the pharmaceutically and/or diagnostically active substance into healthy tissue structures of the body is prevented or that the active substance is not eliminated via the kidneys, thus reducing the extent of damage that the active substance which is not bound to the serum proteins can cause to such structures and to the kidneys. Thus, the pharmacokinetic profile of the pharmaceutically and/or diagnostically active substance is changed and improved since the efficacy of the pharmaceutically and/or diagnostically active substance is increased because it accumulates at the site of action and since, at the same time, the toxic effects on the healthy systems of the body are reduced.

The conjugate according to the present invention is marked by an excellent water solubility. In addition, in vivo the conjugate according to the present invention has, for example, an improved antitumoral efficacy when compared to the pharmaceutically and/or diagnostically active substance that is not bound.

According to a preferred embodiment of the conjugate according to the present invention, the spacer molecule and/or the bond between the pharmaceutically and/or diagnostically active substance and the spacer molecule and/or the bond between the thiol-binding group and the spacer molecule can be hydrolytically and/or pH-dependently and/or enzymatically cleaved. Preferably the spacer molecule and/or the bond between the pharmaceutically and/or diagnostically active substance and the spacer molecule and/or the bond between the thiol-binding group and the spacer molecule contains a minimum of one acid-sensitive bond. Examples of acid-sensitive bonds include ester, acetal, ketal, imine, hydrazone, carboxylhydrazone, and sulfonylhydrazone bonds as well as bonds which contain a trityl group. Bonds that are cleaved by means of hydrolysis with the release of the pharmaceutically and/or diagnostically active substance include, for example, ester bonds or metal complex bonds, such as are present in platinum-dicarboxylate complexes, wherein a diamine [sic; diammine] diaquo-platinum(II) complex is released. Examples of bonds which are not cleavable in the body and which can be present in the bond to the diagnostically active substance are amide bonds, saturated or unsaturated carbon-carbon bonds, or bonds between carbon and a hetero atom, -C-X-, with X preferably standing for O, N, S or P.

According to another embodiment of the conjugate according to the present invention, the spacer molecule and/or the bond between the pharmaceutically and/or diagnostically active

substance and the spacer molecule and/or the bond between the thiol-binding group and the spacer molecule contains a minimum of one peptide bond. The peptide bond is preferably present within a peptide sequence which contains a minimum of one cleavage sequence of a protease. Therefore, the minimum of one peptide bond can be realized by inserting a peptide sequence into the spacer molecule and/or into the bond between the pharmaceutically and/or diagnostically active substance and the spacer molecule and/or into the bond between the thiol-binding group and the spacer molecule, i.e., the bond is a peptide bond and preferably comprises approximately 1 to 30 amino acids. The peptide sequence is preferably tailed to the substrate specificity of certain endogenous enzymes or enzymes which are present in microorganisms or which are produced by microorganisms. Therefore, the peptide sequence or a portion of this sequence is recognized by the enzymes in the body and the peptide is cleaved.

The enzymes are, for example, proteases and peptidases, e.g., matrix metalloproteases (MMP), cysteine proteases, serine proteases, and plasmin activators which are produced in greater quantities or activated in the presence of diseases, such as rheumatoid arthritis or cancer, which leads to an excessive degeneration of tissue, to inflammations, and to the formation of metastases. Target enzymes are, in particular, MMP 2, MMP 3, and MMP 9 which are involved as proteases in the pathological processes mentioned (J. Vassalli and M. S. Pepper (1994), *Nature* 370, pp. 14-15; P. D. Brown (1995), *Advan. Enzyme Regul.* 35, pp. 291-301).

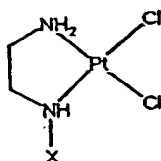
Other proteases that are target enzymes for conjugates according to the present invention are cathepsins, in particular cathepsin B and H, which have been identified as the key enzymes in inflammatory and malignant diseases (T. T. Lah et al. (1998), *Biol. Chem.* 379, pp. 125-301).

According to another embodiment of the conjugate according to the present invention, the spacer molecule and/or the bond between the pharmaceutically and/or diagnostically active substance and the spacer molecule and/or the bond between the thiol-binding group and the spacer molecule contains a minimum of one bond that is enzymatically cleavable but does not consist of a peptide bond. Examples include carbamate bonds which release the active ingredient or an active ingredient derivative by way of a cleavage with enzymes that are specific to a certain disease, e.g., glutathion S transferases, glucuronidases, and galactosidases. It is also possible for an enzymatically cleavable bond to consist of a peptide sequence and one of the above-mentioned bonds that is not a peptide bond.

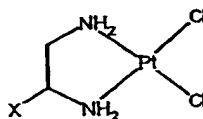
All types of bonds mentioned -- hydrolytically cleavable bond, acid-sensitive bond, peptide bond, enzymatically cleavable bond which does not contain a peptide bond, and a bond which consists of a peptide sequence and a non-peptide bond -- ensure that the pharmaceutically and/or diagnostically active substance or a correspondingly active derivative is extracellularly

and/or intracellularly cleaved at the site of action and that the substance can develop its pharmaceutical and/or diagnostic effect.

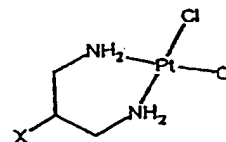
According to a preferred embodiment of the present invention, the pharmaceutically active substance is a cytostatic, a cytokine, an immunosuppressant, an antirheumatic agent, an antiphlogistic agent, an antibiotic, an analgesic, a virostatic, or an antimycotic agent. Especially suitable cytostatics of the conjugates according to the present invention are the N-nitrosoureas, such as nimustine, the anthracyclines doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantrone, and ametantrone and allied derivatives thereof, the alkylating agents chlorambucil, bendamustin, melphalan, and oxazaphosphorines, and allied derivatives of these, the antimetabolites, for example, purine or pyrimidine antagonists, and folic acid antagonists, such as methotrexate, 5-fluorouracil, 5'-deoxy-5-fluorouridine, and thioguanine, and allied derivatives thereof, the taxanes paclitaxel and docetaxel, and allied derivatives thereof, the camptothecines topotecan, irinotecan, 9-aminocamptothecin, and camptothecin, and allied derivatives thereof, the podophyllotoxin derivatives etoposide, teniposide, and mitoposide, and allied derivatives thereof, the vinca alkaloids vinblastine, vincristine, vindesine, and vinorelbine, and allied derivatives thereof, the calicheamicins, the maytansinoids, and cis-configured platinum(II) complex compounds of general formulas I through XII:



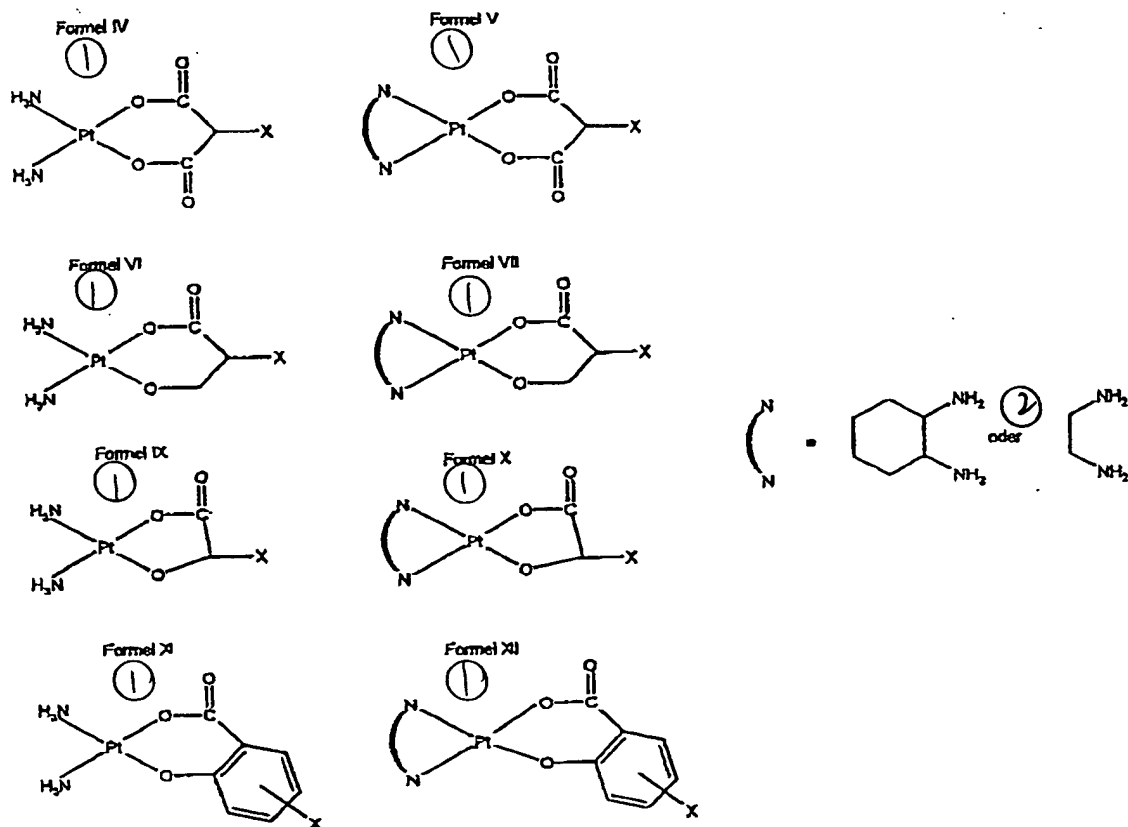
Formel I



Formel II



Formel III



Key: 1      Formula  
       2      or

where X stands for the spacer molecule or for the thiol-binding group.

Especially suitable cytokines for use in conjugates according to the present invention include, for example, interleukin 2, interferon  $\alpha$ -2a, interferon  $\alpha$ -2b, interferon  $\beta$ -1a, interferon  $\beta$ -1b, interferon  $\gamma$ -1b, and allied derivatives thereof. As a rule, the cytokines used are genetically produced drugs.

Especially suitable immunosuppressants for use in conjugates according to the present invention include, for example, cyclosporin A, FK 506, and allied derivatives thereof.

Especially suitable antirheumatic agents for use in conjugates according to the present invention are, for example, methotrexate, sulfasalazine, chloroquine, and allied derivatives thereof.

Especially suitable antiphlogistic and/or analgesic agents for use in the conjugates according to the present invention include, for example, salicylic acid derivatives, such as acetyl salicylic acid and allied derivatives thereof, drug derivatives which contain an acetic or propionic acid group, such as diclofenac and indomethacin or ibuprofen and naproxen, respectively, and aminophenol derivatives, such as paracetamol.

Especially suitable antimycotic agents for use in conjugates according to the present invention include amphotericin B and allied derivatives thereof.

Preferred virostatic agents for use in conjugates according to the present invention include nucleoside analogs, such as acyclovir, ganciclovir, idoxuridine, ribavirin, vidaribine, zidovudine, didanosine, and 2'3'-dideoxycytidine (ddC), and allied derivatives thereof, and amantadine.

Preferred antibiotics for use in the conjugate according to the present invention include sulfonamides, such as sulanilamide, sulfacarbamide, and sulfamethoxydiazine, and allied derivatives thereof, penicillins, such as 6-aminopenicillanic acid, penicillin G and penicillin V, and allied derivatives thereof, isoxazolyl penicillins, for example, oxacillin, cloxacillin, flucloxacillin, and allied derivatives thereof,  $\alpha$ -substituted benzyl penicillins, such as ampicillin, carbenicillin, pivampicillin, amoxicillin, and allied derivatives thereof, acylamino penicillins (e.g., mezlocillin, azlocillin, piperacillin, apalacillin), and allied derivatives thereof, amidino penicillins, such as mecillinam, atypical  $\beta$ -lactams, such as imipenam and aztreonam, cephalosporins, for example, cefalexin, cefradin, cefaclor, cefadroxil, cefixim, cefpodoxim, cefazolin, cefazedon, cefuroxim, cefamandol, cefotiam, cefoxitin, cefotetan, cefmetazole, latamoxef, cefotaxim, ceftriaxon, ceftizoxime, cefmonoxime, ceftazidime, cefsulodin, and cefoperazone, and allied derivatives thereof, tetracyclines, such as tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, demeclocycline, rolitetracycline, doxycycline, and minocycline, and allied derivatives thereof, chloramphenicols, such as chloramphenicol and thiamphenicol and allied derivatives thereof, gyrase inhibitors, such as nalixidic acid, pipemidic acid, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, and enoxacin, and allied derivatives thereof, and antituberculous agents, such as isoniazid and allied derivatives thereof.

It goes without saying that for each mol of the conjugate according to the present invention, one single drug species (for example, one drug containing a cytostatic agent as the pharmaceutically active substance) or several different drug species (for example, several

different cytostatic agents or a cytostatic agent combined with an antiproliferative agent, etc., as the pharmaceutically active substance) can be present in a bound form.

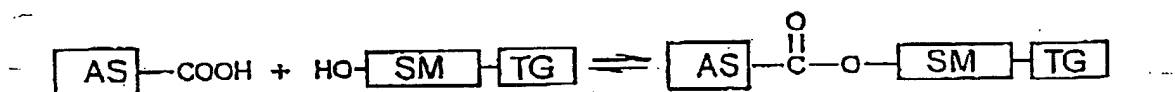
According to another preferred embodiment of the conjugate according to the present invention, the spacer molecule comprises a substituted or unsubstituted branched-chain or unbranched-chain aliphatic alkyl residue with 1 to 12 carbon atoms and/or a minimum of one substituted or unsubstituted aryl residue and/or an aliphatic carbon ring with 3 to 12 carbon atoms. The aliphatic alkyl residue preferably contains 1 to 20 carbon atoms, for example, to increase the water solubility, with such residues preferably being derived from an oligoethylene oxide chain or from an oligopropylene oxide chain. Especially suitable residues which are derived from an oligoethylene oxide chain or from an oligopropylene oxide chain include, for example, diethylene glycol chains, triethylene glycol chains, and dipropylene glycol chains. A preferred aryl residue is an unsubstituted or a substituted phenyl residue in which again one or several carbon atoms may be substituted with hetero atoms. Preferred substituents of the aliphatic alkyl residue or aryl residue are hydrophilic groups, such as sulfonic acid groups, aminoalkyl groups, and hydroxy groups.

Preferred diagnostically active substances for use in the conjugate according to the present invention contain, for example, one or several radionuclide(s), ligands comprising one or several radionuclide(s) and preferably complexing such radionuclides, one or several positron emitter(s), one or several NMR contrast agent(s), one or several fluorescent compound(s), or one or several contrast agent(s) in the near IR range.

In yet another preferred embodiment of the conjugate according to the present invention, the thiol-binding group comprises a maleinimide group, a haloacetamide group, a haloacetate group, a pyridyldithio group, a vinylcarbonyl group, an aziridine group, a disulfide group, or an acetylene group, all of which groups can also be substituted.

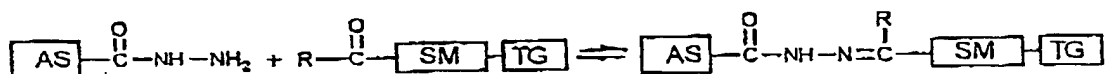
Depending on the functional group present, the drug or drug derivative of the conjugate according to the present invention can be prepared following one of the general descriptions below.

Drugs or drug derivatives of the conjugates according to the present invention which contain an HOOC group can be derivatized, for example, as described below:



The esterification is carried out by means of the conventional methods known from prior art.

It is also possible to convert the HOOC group into a hydrazide group, e.g., by means of a reaction with tert-alkyl carbazates and by the subsequent cleavage with acids (described in the German Patent No. DE 196 36 889), and to react the drug which contains a hydrazide group with a group which contains a carbonyl component consisting of the thiol-binding group and the spacer molecule, such as is described in the German Patent No. DE 196 36 889.



R = H, alkyl, phenyl, substituted phenyl

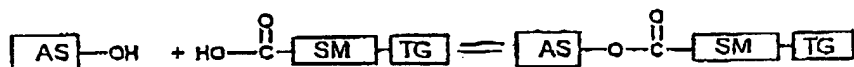
Drugs or drug derivatives of the conjugates according to the present invention which contain an H<sub>2</sub>N group can, for example, be derivatized as follows:



R = H, alkyl, phenyl, substituted phenyl

The reaction to obtain the imine derivatives is carried out using conventional methods known from prior art.

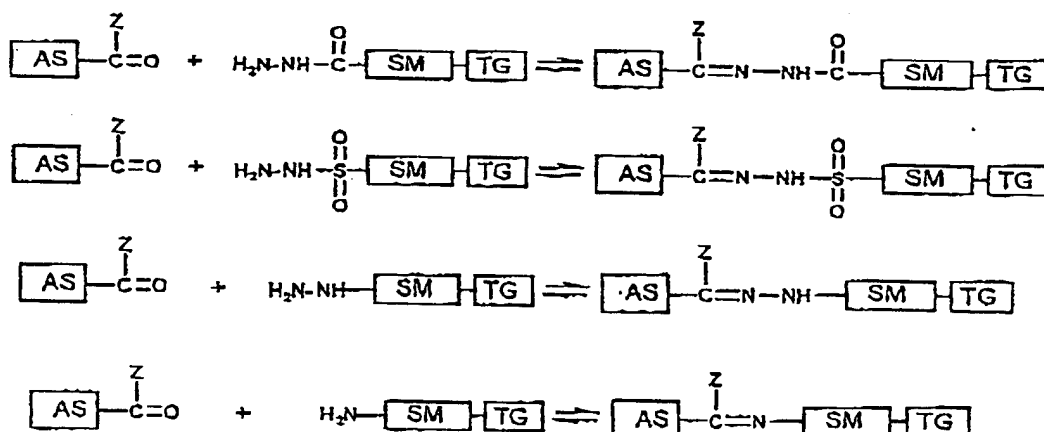
Drugs or drug derivatives of the conjugates according to the present invention which contain an HO group can be derivatized, for example, as follows:



The esterification is carried out by means of conventional methods known from prior art.

Drugs or drug derivatives of the conjugates according to the present invention which contain a carbonyl component can be derivatized, for example, as follows:

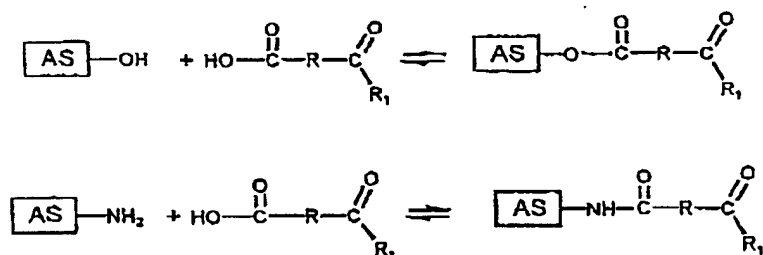




Z = the chemical group of the pharmaceutically and/or diagnostically active substance

The reaction to produce the carboxyhydrazone, sulfonylhydrazone, hydrazone, and imine derivatives is carried out following the methods known from prior art.

It is also possible to convert an HO group or an NH<sub>2</sub> group of a pharmaceutically and/or diagnostically active substance into a carbonyl component, for example, by esterification or amide formation with a carbonyl component containing a carboxylic acid according to the general reaction equations below:



where R stands for an aliphatic carbon chain and/or an aliphatic carbon ring and/or an aromatic hydrocarbon and where R<sub>1</sub> is H, alkyl, phenyl, an unsubstituted phenyl group or a substituted phenyl residue. R generally has 1 to 12 carbon atoms which may optionally be substituted, for example, with hydrophilic groups, such as sulfonic acid groups, aminoalkyl groups, or hydroxy groups. Preferably the aromatic hydrocarbon is a benzene ring which may optionally be substituted. Preferred substituents include, for example, the hydrophilic groups mentioned above.

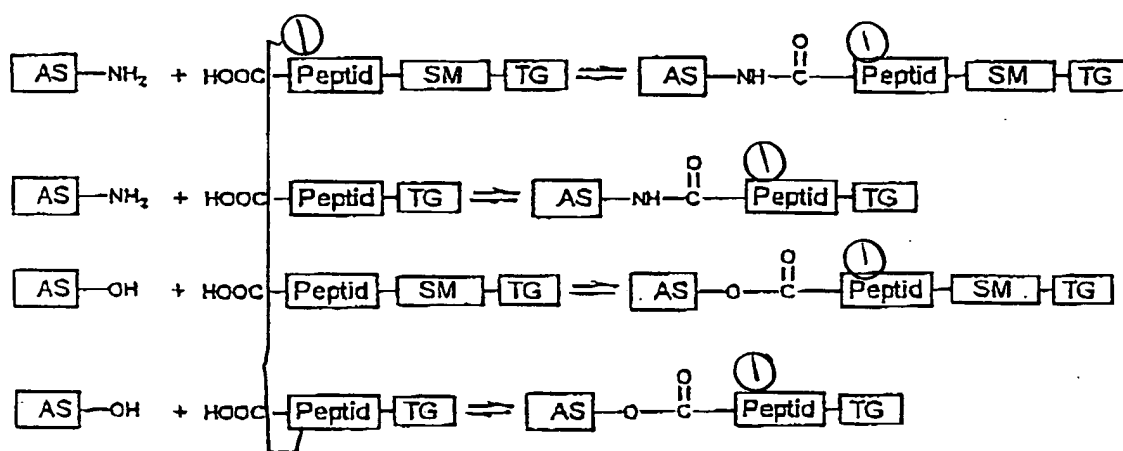
The carbonyl component can also be introduced using other chemical reactions, for example, an electrophilic substitution at the HO or NH<sub>2</sub> group of the active ingredient with a suitable carbonyl component.

The drugs thus derivatized which now contain a carbonyl component are subsequently reacted as described in the methods mentioned above with the carrier molecule-binding spacer molecules which contain an amino group, a hydrazide group, or a hydrazine group to form the corresponding carboxylhydrazone, sulfonylhydrazone, hydrazone, and imine derivatives. The cleavage of these acid-sensitive bonds thus leads to the release of the derivatized pharmaceutically and/or diagnostically active substance which contains a carbonyl component.

The groups which comprise the thiol-binding group and the spacer molecule can be produced, e.g., according to methods which are described, among other things, in the German Patent No. DE-A-196 36 889; by U. Beyer et al., 1997 (Chemical Monthly 128, p. 91, 1997); by R. S. Greenfield et al., 1990 (Cancer Res. 50, p. 6600, 1990); by T. Kaneko et al., 1991 (Bioconjugate Chem. 2, p. 133, 1991); in Bioconjugate Techniques (G. T. Hermanson, Academic Press, 1996); or in the U.S. Patent No. 4,251,445.

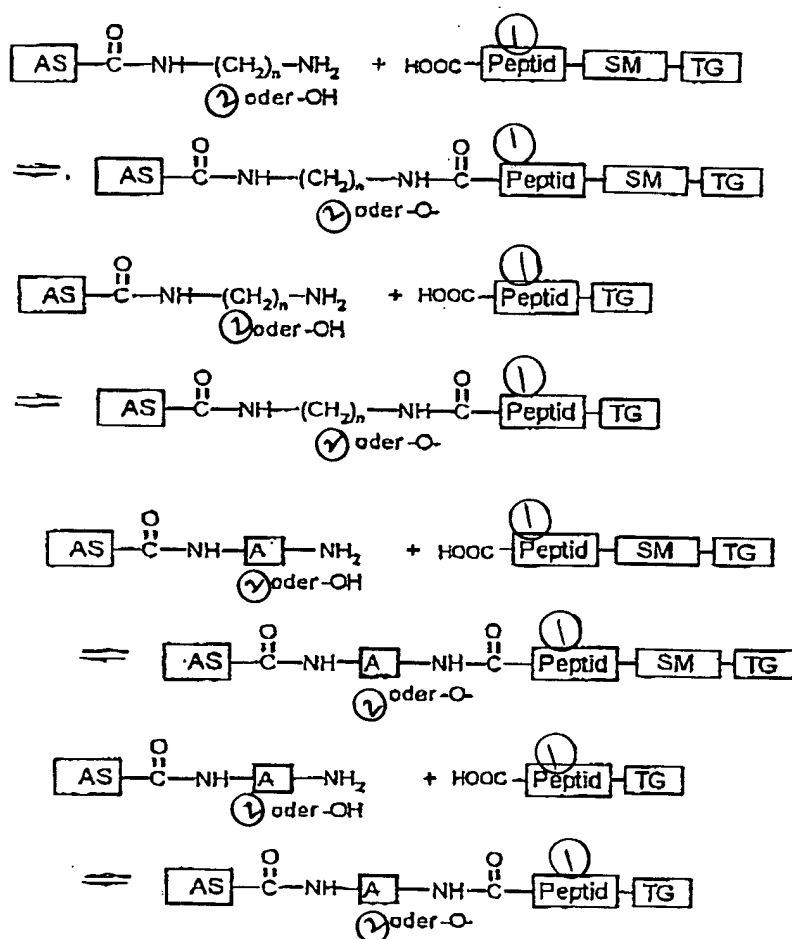
Drugs or drug derivatives for use in the conjugates according to the present invention which contain a peptide bond can be produced, for example, by reacting a peptide which consists of 2 to approximately 30 amino acids with a thiol-binding compound in such a way that a thiol-binding group is introduced either directly or via a spacer molecule to the N-terminal end of the peptide. The synthesis of such carrier molecule-binding peptide derivatives preferably takes place by means of a solid-phase synthesis which is known to those skilled in the art, where in the last step of the peptide synthesis, a spacer molecule containing a carboxylic acid and binding a carrier molecule, e.g., a maleinimidocarboxylic acid, is bound by means of the peptide bond to the N-terminal end of the peptide, and the carrier molecule-binding peptide is subsequently cleaved off the solid phase.

The peptide derivatives obtained in this manner can be reacted with drugs or drug derivatives which contain an  $H_2N$  or an  $HO$  group, in the presence of a condensation agent, such as  $N,N'$ -dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or  $N$ -cyclohexyl- $N'$ -(2-morpholinoethyl)carbodiimide methyl- $p$ -toluenesulfonate (CMC) or (benzotriazol-1-yloxy)trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (pyBOP) or  $O$ -benzotriazol- $N,N,N',N'$ -tetramethyluronium hexafluorophosphate, with the optional addition of  $N$ -hydroxysuccinimide or a water-soluble  $N$ -hydroxysuccinimide, such as the sodium salt of  $N$ -hydroxysuccinimide-sulfonic acid or 1-hydroxybenzotriazol and/or in the presence of a base, such as  $N$ -methylmorpholine or triethylamine, to form the corresponding thiol-binding drug-peptide derivatives.



Key: 1 Peptide

Furthermore, it is possible to introduce an  $\text{H}_2\text{N}$  group or an  $\text{HO}$  group via the  $\text{HOOC}$  group of the drugs in the conjugates according to the present invention, for example, by means of derivatization by way of the  $\alpha$ -amino group of the amino acids lysine, serine, or threonine or with a diamino compound of the general formula  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  or with an alcohol amine of the general formula  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CN}_2)_n-\text{OH}$ , where  $n = 1$  to  $12$ , and to subsequently react these derivatives with the peptide derivatives mentioned above to form the corresponding thiol-binding drug-peptide derivatives.



A = lysine, serine, or threonine

Key: 1      Peptide  
       2      or

The substrate specificity of target enzymes, such as MMP 2, MMP 3, MMP 9, cathepsin B and H, is well known (Netzel-Arnett et al. (1993), Biochemistry 32, pp. 6427-6432; S. Shuja, K. Sheahan, and M. J. Murnane (1991), Int. J. Cancer 49, pp. 341-346; T. T. Lah and J. Kos (1998), Biol. Chem. 379, pp. 125-130).

Thus, for example, octapeptides ( $P_4-P'_4$ ) which simulate the cleavage sequence of the collagen chain and which are especially effectively cleaved by MMP 2 and 9 have been identified for MMP 2 and MMP 9 (below, amino acids are abbreviated in correspondence with the international three letter code):

Table I:

Peptid ①							
P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	P' <sub>1</sub>	P' <sub>2</sub>	P' <sub>3</sub>	P' <sub>4</sub>
<hr/>							
Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln							
Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln							
(Netzel-Arnett et al., <i>Biochemistry</i> 32, 1993, 6427-6432)							

Key: 1      Peptide

The peptides are enzymatically cleaved only at the P<sub>1</sub>-P'<sub>1</sub> bond.

In addition, substrate-specific dipeptides with the sequence Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu, -Arg-Arg-, or -Phe-Lys are known for cathepsin B (B. Werle, E. Ebert, W. Klein, and E. Spiess (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, pp. 157-164; B. Ulrich, E. Spiess, R. Schwartz-Albiez, and W. Ebert (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, pp. 404-414).

The peptide sequence which contains the predetermined breaking point of peptide that is relevant for the target enzyme can also be built up in such a manner that the predetermined breaking point of peptide is repeated several times, for example, by:

-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln

or

-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-Phe-Lys-

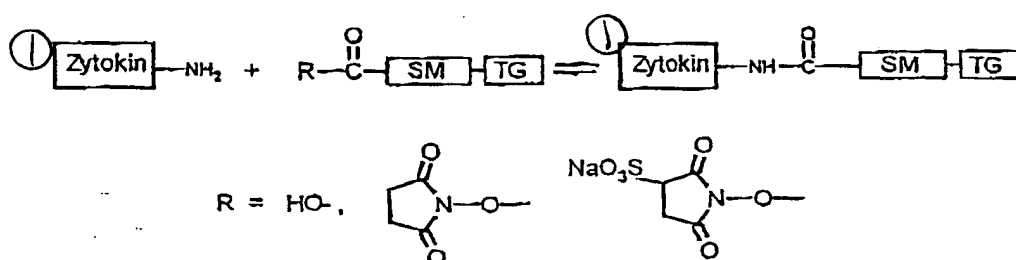
or it is also possible to integrate a repetitive peptide sequence which increases the distance between the thiol-binding group and the relevant predetermined breaking point of peptide, for example, by:

-(Gly)<sub>n</sub>-Phe-Lys-Phe-Lys-

where preferably n = 2 to 20, and especially n ≤ 12.

A very important aspect of this embodiment of the conjugate according to the present invention is that the predetermined breaking point of the peptide that is relevant to a given target enzyme is present at least once in an oligopeptide consisting of 1 to 30 amino acids. The oligopeptides mentioned above are only representative examples for the enzymatically cleavable bond in the conjugates according to the present invention and do not in any way limit the present invention.

Drug or drug derivatives of the conjugates according to the present invention which contain a cytokine can be produced, for example, by reacting the cytokine with a spacer molecule which contains a thiol-binding group and which has a carboxylic acid or an activated carboxylic acid:



Key: 1 Cytokine

When the spacer molecule contains an N-hydroxysuccinimide ester group (N-hydroxysuccinimide or N-hydroxysuccinimide-3-sulfonic acid, sodium salt), it is reacted directly with the cytokine. The reaction of the cytokine with a spacer molecule containing a thiol-binding group and a carboxylic acid takes place in the presence of a condensation agent, such as N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate (CMC), optionally with an addition of N-hydroxysuccinimide or the sodium salt of N-hydroxysuccinimide-3-sulfonic acid, to form the corresponding thiol-binding cytokine derivatives. As a rule, the purification of the cytokines derivatized in this manner is carried out using exclusion chromatography. The reactions described above are known to those skilled in the art (see, e.g., Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson, Academic Press, 1996).

The drugs or drug derivatives described above are bound to a carrier containing a polypeptide sequence with one or several cysteine residues, such as native or recombinant albumin, so that in the conjugate according to the present invention per mol of cysteine residue, more than 0.7 mol, preferably a minimum of 0.9 mol, of the drug are bound to the carrier via thiol-binding groups. When the polypeptide sequence of the carrier contains n (for example, 3) cysteine residues, this means that 1 mol of this carrier contains n (for example, 3) mol of cysteine

residues and that, as a result, per mol of the corresponding conjugate, a maximum of  $n$  (for example, 3) mol of the drug can be present in bonded form in the carrier. Therefore, in the ideal case, in the conjugate according to the present invention, 100% of the cysteine residues contained in the carrier are bound via the thiol-binding group to the drug.

Yet another embodiment according to the present invention therefore relates to a method for the production of a conjugate as defined above, comprising

- (i) a treatment of the carrier with a reduction agent to ensure that more than 0.7 mol, preferably a minimum of 0.9 mol, of cysteine SH groups per mol of cysteine residue are present in the carrier and
- ii) binding the drug via the thiol-binding group to the cysteine SH groups in the carrier.

In a preferred embodiment of the method according to the present invention, the reduction agent used to treat the carrier is dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), or mercaptoethanol. The reduction agent especially preferred is DTT.

The method according to the present invention is based on the discovery that the carriers known from prior art are present in a nonhomogeneous oxidation status. For example, in the case of commercially available native albumin, using the photometric assay according to Ellman, it is as a rule possible to detect  $\approx 0.2$  to 0.7 mol of HS groups per mol of cysteine residues in the albumin, i.e., cysteine-34 is frequently oxidized by sulfur-containing compounds, such as cysteine or glutathion, by way of a disulfide bond. This means that in at least many cases, the cysteine SH groups present in the albumin are not free, which so far always meant that the yield of conjugates produced was excessively low and/or varied too much from one albumin batch to the next.

According to the present invention, it was discovered that commercially available carriers can be treated with a reduction agent, which reduces the cysteine groups that have been oxidized by means of disulfide bonds, thus ensuring that more than 0.7 mol of cysteine SH groups per mol of cysteine residues are present in the carrier. The reaction is preferably controlled to ensure that a minimum of 0.9 mol of cysteine CH groups per mol of cysteine residue are available in the carrier.

The reaction of the reduction agent with the commercially available carrier, e.g., albumin, takes place, for example, in a salt buffer, e.g., in 0.01 M sodium borate, 0.15 M NaCl, 0.001 M EDTA, or 0.15 M NaCl, 0.004 M phosphate in a pH range from 5.0 to 8.0, preferably from 6.0 to 7.0. The reduction agent can be used in excess, preferably the ratio between the reduction agent and the carrier is between 0.5:1 and 10:1. The reaction time ranges from 1 h to 96 h, preferably from 6 h to 24 h.

The carriers treated with the reduction agent is isolated, e.g., by means of gel filtration (for example, Sephadex® G10 or G25, mobile solvent: 0.004 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) or by means of ultrafiltration.

After the gel filtration is concluded, the carrier concentration is determined by means of the coefficient of extinction at 280 nm, the number of the HS groups introduced is determined by means of Ellmann's reagent at 412 nm. The carrier solution thus isolated can be used directly in the synthesis of the conjugates. It is also possible to reconcentrate or to freeze-dry the carrier solution with a commercially available concentrator. The isolated carrier solution or the lyophilisate can be stored in a temperature range from -78°C to +30°C.

The drug derivatives described above can be bound to the carrier, for example, at room temperature. For this purpose, an approximately 1.1- to 10-fold excess of the drug that has been prepared as described above (relative to the number of the HS groups present in the carrier), dissolved in a minimum quantity of solvent, for example, DMF, dimethyl sulfoxide, water, salt buffer, ethanol, methanol, propylene glycol, glycerol, acetonitrile, or THF (approximately 1 to 10% of the volume of the carrier sample), is added to the carrier which is in a salt buffer (for example, 0.15 M NaCl, pH 6.0 to 8.0) that had optionally been degassed prior thereto. It is also possible to add the drug in the form of a solid substance to the carrier solution. In addition, it may also be useful to add an auxiliary agent, such as a fatty acid or a tryptophonate derivative, to the carrier solution prior to binding [the drug derivatives to the carrier]. After a reaction time from 5 min to 48 h, the solution is centrifuged, if necessary, and the carrier-drug conjugate that formed is isolated by means of subsequent gel filtration (for example, Sephadex® G10 or G25) in a salt buffer, for example, 0.004 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 6.0 to 8.0.

The purity of the conjugate can be tested, for example, by means of HPLC, e.g., by exclusion chromatography. In contrast to conventional conjugates, the conjugates produced according to one of the preferred embodiments of the method according to the present invention has a purity higher than 95%.

The solution of the conjugate thus obtained can be reconcentrated using a commercially available concentrator. The conjugates, when in dissolved form, can be stored at +1°C to +30°C or, when in frozen form, at  $T = 0^{\circ}\text{C}$  to -78°C. Furthermore, it is also possible to freeze-dry the conjugates and to store the lyophilisate at +30°C to -78°C.

Yet another embodiment of the present invention relates to a drug containing a conjugate as defined above and optionally a pharmaceutically compatible carrier and/or auxiliary agent and/or a diluting agent. The drug according to the present invention can preferably be used in the treatment of cancer diseases, autoimmune diseases, acute or chronic inflammatory diseases, and diseases that are caused by viruses and/or microorganisms, such as bacteria and/or fungi.



And yet another embodiment of the present invention relates to a diagnostic kit containing a conjugate as defined above. The diagnostic kit according to the present invention preferably can be used to detect the diseases mentioned above and/or to identify molecules of the carrier and/or the distribution thereof in the body.

The figures show:

Figure 1(A), an HPLC chromatogram of a conjugate according to the present invention (A-DOXO-HYD-C). The absorption at 495 nm is plotted against the retention time in min. (B) is the corresponding HPLC chromatogram of commercially available albumin (Immuno GmbH).

Figure 2, HPLC chromatograms (exclusion chromatographic column Biosil 250 SEC of the firm of Biorad) of a conjugate according to the present invention (HSA-Cys<sup>34</sup>-2) which can be cleaved by means of matrix metalloprotease MMP 9. The absorption at 495 nm is plotted against the retention time in min. (A) Chromatogram of conjugate HSA-Cys<sup>34</sup>-2 prior to incubation with MMP 9 (t = 0). (B) Chromatogram of conjugate HSA-Cys<sup>34</sup>-2 following incubation with MMP 9 for 30 min (t = 30 min).

Figure 3, a diagrammatic representation of the weights and volumes of kidneys and kidney tumors (A) and the weights of lungs and the number of lung metastases (B) of mice in which a kidney carcinoma had been provoked and which had been subjected to the treatment described (controls: no treatment; albumin control: native albumin; Doxo: doxorubicin; A-DOXO-HYD-C: conjugate according to the present invention). For reasons of comparison, the data for mice into which no tumor cells had been injected are shown as well (no tumor).

The following example will illustrate the present invention in greater detail, without, however, intending to limit it in any way.

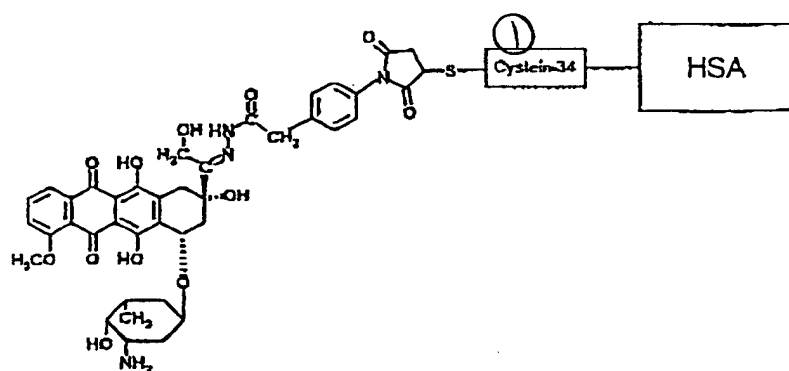
## EXAMPLE

### Reaction of human serum albumin (HSA) with dithiothreitol (DTT)

The method for treating HSA with a reduction agent is explained in greater detail on the basis of the following example: 2.0 g of human serum albumin (10 mL of a 20% HSA solution, Pharma Dessau) are diluted with 10 mL of buffer A (0.004 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl; pH 7.0) and mixed with 100  $\mu$ L of a freshly prepared  $0.036 \times 10^{-2}$  M DTT solution (5.55 mg of DDT dissolved in 100  $\mu$ L of buffer A); the reaction vessel, with air excluded, is subsequently gently shaken for 16 h at room temperature. Subsequently, the albumin solution is reconcentrated by gel filtration (column 5.0 cm x 25.0 cm, Sephadex® G25; mobile solvent 0.004 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4. After the gel filtration was concluded, the protein concentration was photometrically determined at 280 nm  $\epsilon$  (HSA)<sub>280</sub> =  $35.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  -  $c[\text{HSA}] \approx 3.1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), and the number of the introduced HS groups was determined by means of Ellmann's

The purity of conjugate A-DOXO-HYD-C was tested by means of HPLC using an analytical column (Bio-Sil SEC 250 (300 mm x 7.8 mm) of Bio-RAD (mobile phase: as a rule, 0.15 M NaCl, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5% CH<sub>3</sub>CN, pH 7.0) at  $\epsilon = 495$  nm. The HPLC chromatograms for A-DOXO-HYD-C and for the commercially available native albumin (Immuno GmbH) are shown in Figure 1A (A-DOXO-HYD-C) and in Figure 1B (native albumin). It can be clearly seen that A-DOXO-HYD-C has an excellent purity which is comparable to that of commercially available native albumin.

Structure of A-DOXO-HYD-C:

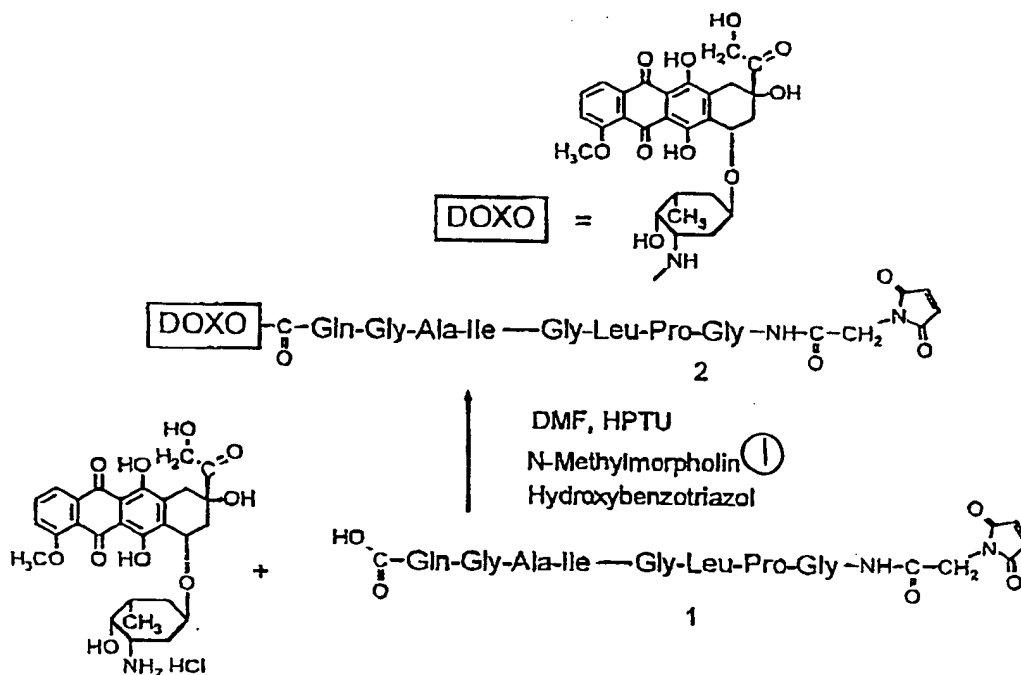


(HSA = human serum albumin)

Key: 1 Cysteine

Preparation of a conjugate according to the present invention consisting of HSA which has been treated with DTT and a doxorubicin-maleinimide peptide derivative which can be cleaved by means of MMP 9.

The doxorubicin-maleinimide-peptide derivative (2) was prepared following the reaction equation below:



Key: 1 N-Methylmorpholine

The octapeptide Gln-Gly-Ala-Ile-Gly-Leu-Pro-Gly 1 (Mr 848 prepared by means of solid-phase synthesis by Bachem AG, Switzerland) was reacted with doxorubicin according to the following method:

25 mg of 1 (in the form a trifluoroacetate salt) dissolved in 500  $\mu\text{L}$  of DMF, 33,5 mg of O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HPTU) dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of DMF, 11.9 mg of hydroxybenzotriazol hydrate dissolved in 100  $\mu\text{L}$  of DMF, and 16.2  $\mu\text{L}$  of N-methylmorpholine were added to a slightly cloudy solution of 17.1 mg of doxorubicin in 3 mL of DMF, and the solution was subsequently stirred for 18 h in the dark at RT. DMF was removed under a high vacuum, and the solid was taken up in 20 mL of methanol, filtered, and concentrated to 1 mL in vacuo. After purification with silica gel (acetic ester/methanol 2/1), 5 mg of 2 were obtained.

3.0 mL of an HSA sample that had been treated with DTT (sulfhydryl content of 0.95 per HSA molecule, content of HS groups  $\sim 1000 \mu\text{M}$ ) were mixed with a solution of 2 (Mr 1374) in DMF (5.1 mg dissolved in 250  $\mu\text{L}$  of DMF), and the reaction solution was gently shaken for 30 min. The albumin-doxorubicin conjugate obtained was isolated in a Sephacryl® HR100 column (2.0 cm x 20 cm). In this manner, the albumin conjugate (hereinafter referred to as HSA-Cys<sup>34</sup>-2) with the following structure was isolated (loading factor = 0.9).

Table 2

① Anzahl der Mäuse	② Substanz	③ Dosis (mg/Kg/inj.)	④ Mortalität (d)	⑤ Durchschnittliche Körpergewichts- abnahme (%) d 1 bis 25
10	⑥ Kontrolle		2	- 14
10	⑦ Albumin-Kontrolle	4x1,4 g	1	- 16
10	Doxorubicin (Doxo)	4x6 mg/kg ⑧	1	- 21
10	A-DOXO-HYD-C	4x12 mg/kg ⑨	0	- 18

Key:	1	Number of mice
	2	Substance
	3	Dose (mg/BW/inj.)
	4	Mortality (d)
	5	Average loss of body weight (%) d 1 to 25
	6	Control
	7	Albumin control
	8	4 x 6 mg/body weight
	9	4 x 12 mg/body weight

The dose refers to the quantity of doxorubicin present. The doses of doxorubicin and A-DOXO-HYD-C have approximately the same toxicity (see column for average loss of body weight in Table 2).

In Figure 3, the results of this experiment with respect to the losses and the volumes of the kidneys and kidney tumors (Figure 3A) and the weights of the lungs and the number of the lung metastases (Figure 3B) are diagrammatically presented. It is seen that A-DOXO-HYD-C has an excellent antitumoral efficacy and leads to a complete remission in all animals. Macroscopically visible lung metastases were observed only in one animal (Figure 3B). In the group that had been treated with doxorubicin, on the other hand, clearly visible kidney tumors were observed in all animals (Figure 3A), i.e., at the optimum dose of doxorubicin (loss of body weight: -21% (d 1 to 25); death of 1 animal), complete remissions were not achieved. Furthermore, in the mice that had been treated with free doxorubicin, the number of lung

metastases counted amounted to an average of approximately 100 metastases per mouse (Figure 3B).

### Claims

1. A carrier-drug conjugate, comprising a carrier, which contains a polypeptide sequence with one or several cysteine residues, and a drug containing a pharmaceutically and/or diagnostically active substance, a spacer molecule, and a thiol-binding group, with more than 0.7 mol of the drug per mol of cysteine residue being bound to the carrier via the thiol-binding group.
2. The conjugate as claimed in Claim 1, wherein the carrier is native or recombinant albumin.
3. The conjugate as claimed in Claim 1 or 2, wherein the spacer molecule and/or the bond between the pharmaceutically and/or diagnostically active substance and the spacer molecule and/or the bond between the thiol-binding group and the spacer molecule can be hydrolytically and/or pH-dependently and/or enzymatically cleaved.
4. The conjugate as claimed in Claim 3, wherein the spacer molecule and/or the bond contain(s) a minimum of one peptide bond..
5. The conjugate as claimed in Claim 4, wherein the peptide bond is present within a peptide sequence which contains a minimum of one cleavage sequence of a protease.
6. The conjugate as claimed in any one of Claims 3-5, wherein the spacer molecule and/or the bond contain(s) a minimum of one acid-sensitive bond.
7. The conjugate as claimed in any one of Claims 1-6, wherein the pharmaceutically active substance is a cytostatic, a cytokine, an immunosuppressant, an antirheumatic agent, an antiphlogistic agent, an antibiotic, an analgesic, a virostatic, or an antimycotic.
8. The conjugate as claimed in Claim 7, wherein the cytostatic is selected from the group of the anthracyclines, the N-nitrosoureas, the alkylating agents, the purine or pyrimidine antagonists, the folic acid antagonists, the taxanes, the camptothecines, the podophyllotoxin derivatives, the vinca alkaloids, the calicheamicines, the maytansinoids, or the cis-configured platinum(II) complexes.
9. The conjugate as claimed in any one of Claims 1-8, wherein the diagnostically active substance comprises one or several radionuclide(s), ligands which comprise one or several radionuclide(s), one or several positron emitter(s), one or several NMR contrast agent(s), one or several fluorescent compound(s), or one or several contrast agents in the near IR range.
10. The conjugate as claimed in any one of Claims 1-9, wherein the thiol-binding group comprises a maleinimide group, a haloacetamide group, a haloacetate group, a pyridyldithio

group, a vinylcarbonyl group, an aziridine group, a disulfide group, or an acetylene group, all of which may optionally be substituted.

11. The conjugate as claimed in any one of Claims 1-10, wherein the spacer molecule comprises a substituted or unsubstituted, branched-chain or unbranched aliphatic alkyl residue with 1 to 12 carbon atoms and/or a minimum of one substituted or unsubstituted aryl residue and/or an aliphatic carbon ring with 3 to 12 carbon atoms.

12. A method for the production of the conjugate as claimed in any one of Claims 1-11, comprising

(i) a treatment of the carrier with a reduction agent to ensure that more than 0.7 mol, preferably a minimum of 0.9 mol, of cysteine SH groups per mol of cysteine residues are present in the carrier,

(ii) bonding the drug via the thiol-binding group to the cysteine SH groups in the carrier.

13. The method as claimed in Claim 12, wherein the reduction agent is dithiothreitol, dithioerythritol, or mercaptoethanol.

14. The method as claimed in Claim 12 or 13, wherein the conjugate prepared has a purity of more than 95%.

15. A drug comprising the conjugate as claimed in any one of Claims 1-11 and optionally a pharmaceutically compatible carrier and/or an auxiliary agent and/or a diluting agent.

16. The drug as claimed in Claim 15 for the treatment of cancer diseases, autoimmune diseases, acute or chronic inflammatory diseases, and diseases that are caused by viruses and/or microorganisms.

17. A diagnostic kit containing the conjugate as claimed in any one of Claims 1-11.

18. The kit as claimed in Claim 17 for the identification of cancer diseases, autoimmune diseases, acute or chronic inflammatory diseases, and diseases that are caused by viruses and/or microorganisms and/or the detection of molecules of the carrier and/or their distribution in the body.

RUN# 101 MAR 6. 1981 23150155

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA*
4.461	746394	PV	.413	6.38296
6.123	234868	VH	.366	1.98754
6.894	11289792	ISHP	.271	92.88958

TOTAL AREA=1.2278E+07  
MUL FACTOR=1.8888E+00

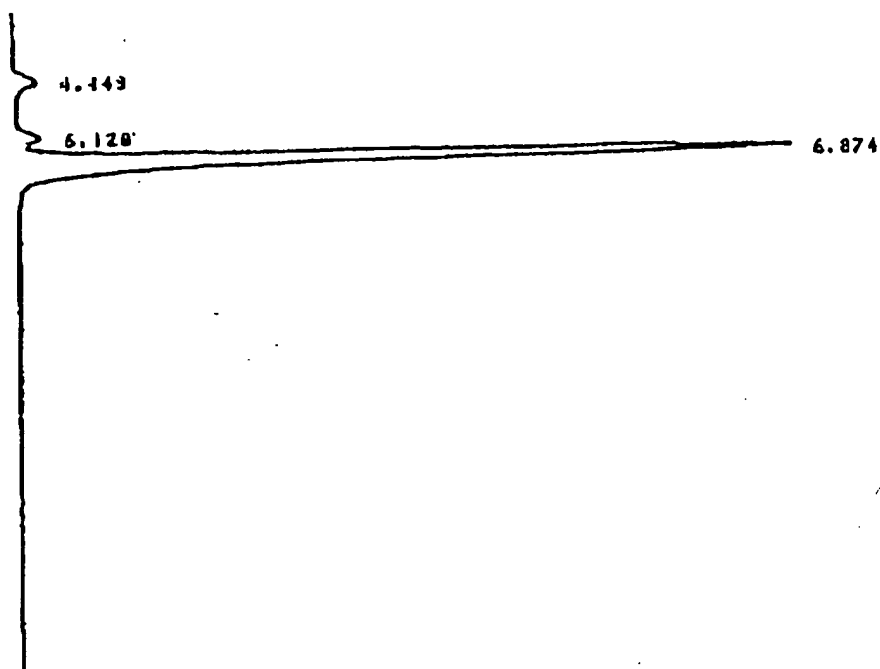
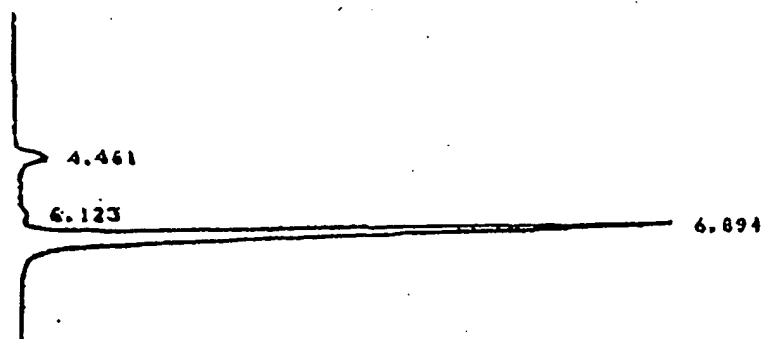


Figure 1A



STOP

Figure 1B

t = 0 min

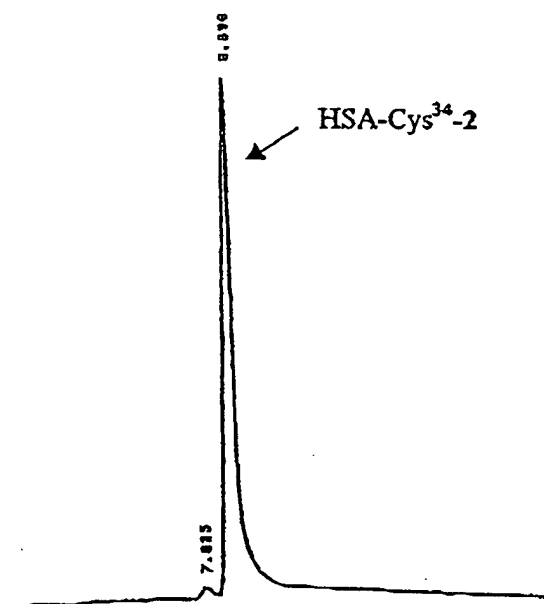


Figure 2A

t = 30 min

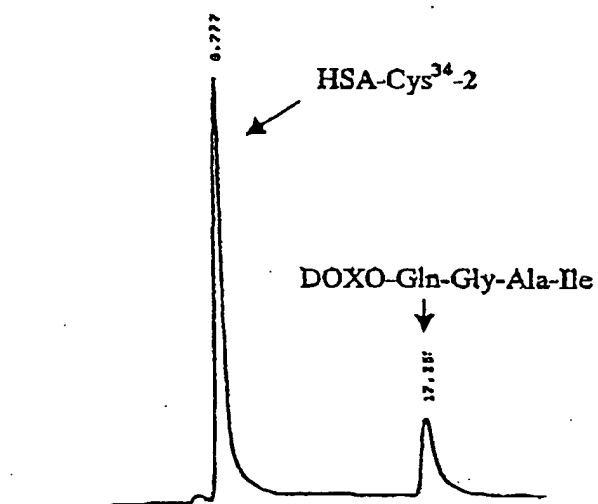


Figure 2B



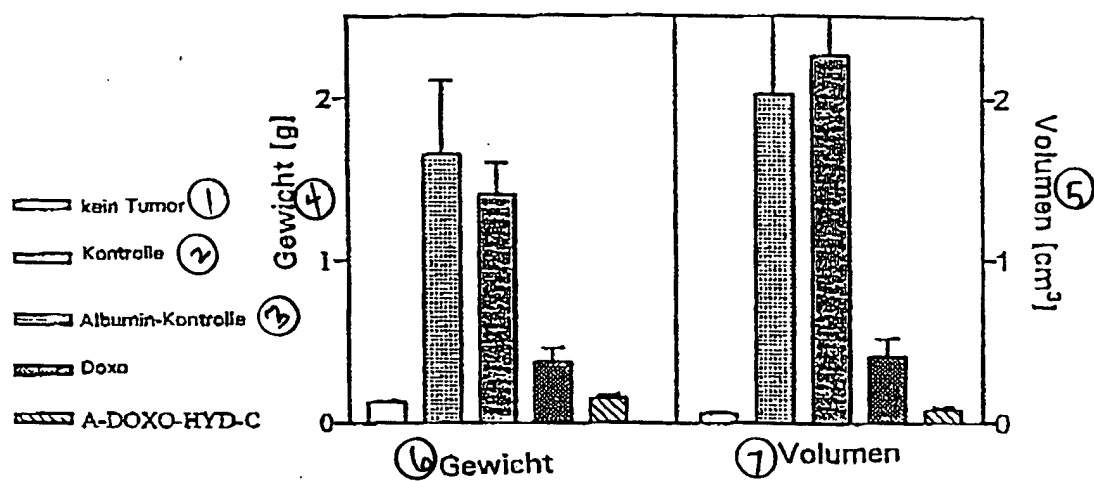


Figure 3A

- Key:
- 1 No tumor
  - 2 Control
  - 3 Albumin control
  - 4 Weight (g)
  - 5 Volume (cm³)
  - 6 Weight
  - 7 Volume

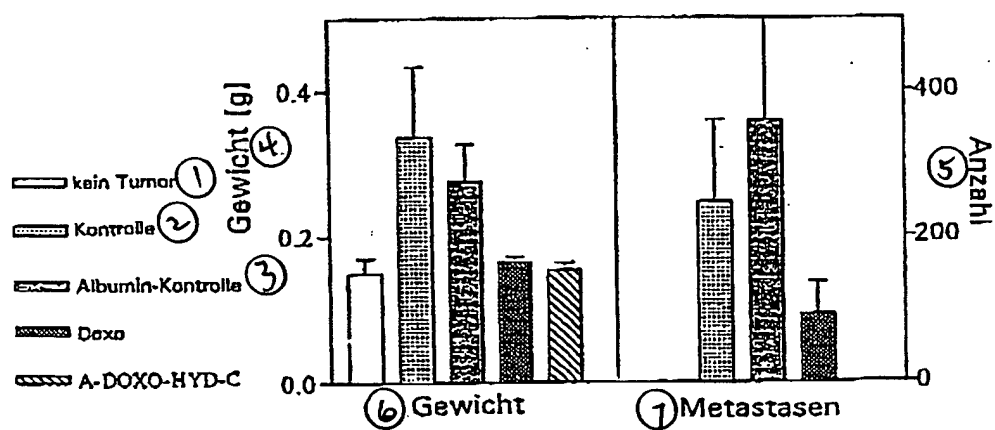


Figure 3B

- Key:
- 1 No tumor
  - 2 Control
  - 3 Albumin control
  - 4 Weight (g)
  - 5 Number
  - 6 Weight
  - 7 Metastases